

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**

**Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de  
DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS**

**TITULO DEL TRABAJO: ESTUDIO EPIZOOTIOLÓGICO DE COLERA AVIAR  
EN BAHIA ESPERANZA, ANTARTIDA.**

**AUTOR: LEOTTA, Gerardo Anibal**

**DIRECTOR: PECORARO, Marcelo Ricardo**

**CODIRECTOR: LANDONI, María Fabiana**

**LUGAR DE TRABAJO**

**Laboratorio de Diagnóstico e Investigaciones Bacteriológicas, Facultad de Ciencias  
Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata**

**MIEMBROS DEL JURADO**

**RIVAS, Marta**

**MARSCHOFF, Enrique**

**PETRUCCELLI, Miguel Angel**

**2005**

A Cecilia

A Camila, Tobías y Francisco

A la memoria de la Expedición Antártica del Dr. Otto Nordenskjöld (1901-1903)

## **AGRADECIMIENTOS**

El presente trabajo de tesis es la culminación de una maravillosa aventura que comenzó en noviembre de 1993. Luego de siete Campañas Antárticas de Verano, en las que aprendí y aplique los conocimientos adquiridos, pude concretar un trabajo epizootiológico sin precedentes en el Area del Tratado Antártico. Es mi deseo que esta tesis doctoral contribuya al conocimiento de las enfermedades que afectan a la fauna antártica para poder preservarla, especialmente de nosotros mismos.

Agradezco a las autoridades de la Dirección Nacional del Antártico por brindarme el apoyo logístico y humano mediante el cual fue posible realizar este estudio. A Coco Coria, responsable del Proyecto Aves, por confiar en mí.

Este trabajo no pudo ser realizado sin la confianza y la colaboración de colegas, compañeros y amigos. Agradezco a Javier Martino, Agustín Rius, Gustavo Daneri, Carlitos Vásquez, Martín Gray y Mario Pérez Cometto, compañeros de travesía con quienes compartí vivencias inolvidables en Jubany, Orcadas y Esperanza entre los años 1993 y 2001. Especialmente agradezco a Ricardo Gunski, quién me demostró que no existen objetivos imposibles.

Agradezco a todos los que me alentaron y acompañaron desde la primer campaña (1993-1994): Cecilia, mi vieja, Andrés, Gustavo y toda mi familia. A Eduardo, Mascarita y Pepe. A la Negra Alonso y a mis compañeros del Instituto de Anatomía de la Facultad: Mily, Pablo R., Pablo P., Jimena, Hector, Walter, Liliana S., Lili, Zucco, Pitufu, Gerardo M. y Willy. A mis compañeros de la Cátedra de Patología de Aves y Pilíferos: Menéndez, Petru, Piscopo, Javier, Miguel H., Florencia, Norberto y Graciela. A Aban, quien realizó los cortes histopatológicos de

las aves que analicé en todos estos años. A mis compañeros de la Cátedra de Micología Médica e Industrial: Reinoso, Susana, Cecilia, Betina, María Laura, Gabriela y Fabian.

A todos los integrantes del Laboratorio de Diagnóstico e Investigaciones Bacteriológicas, que además de colaborar, sumarse y participar en nuevos proyectos para el estudio de las enfermedades infecciosas que afectan a la fauna antártica, me acompañaron acá y en la Antártida: Gabriela, Fabiana, Florencia, Fabio, Walter, Raúl y Pablo. Mi especial agradecimiento a Germán Vigo, socio antártico y amigo, con quién diseñamos, muestreamos, procesamos y analizamos todas las muestras desde 1998. A Pablo Piñeyro, que con mucha paciencia supo brindarme su colaboración para realizar el análisis estadístico, especialmente durante los calurosos meses del verano 2004-2005.

Agradezco infinitamente a Marta, Isabel y Germán del Servicio Fisiopatogenia, Departamento Bacteriología, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas - ANLIS “Carlos G. Malbrán”, por hacerme un lugar en el Servicio, enseñarme las técnicas moleculares y sobre todo por valorar mi entusiasmo. A Eli, Ariela, Natalia, Eduardo, Estela, Carolina, Julieta, Natalia y Anita, quienes desinteresadamente me brindaron su apoyo.

Agradezco al personal del Servicio Virus Respiratorios, Departamento Virología, INEI - ANLIS “Carlos G. Malbrán”, por brindarme su colaboración en el diagnóstico virológico diferencial: Vilma, Elsa, Andrea, Estela, Ana y Karina.

A Viviana Ritacco por permitirme utilizar el programa BioNumerics. A Cesar García Esponda por coleccionar las muestras de la CAV 2001-2002. A Irina Izaguirre por facilitarnos el equipo Hanna para determinar las características físico-químicas de los cuerpos de agua dulce. A Mark J. Wolcott por la determinación del tipo capsular, del serotipo somático y la secuenciación de la molécula 16S del ARNr de las cepas. A Pat Blackall y José Luis Garbi por enviarnos las

cepas de aves domésticas de Australia y Argentina, respectivamente. A Santiago Corva por su asesoramiento en el análisis de los datos.

Agradezco la cordialidad, buena predisposición y paciencia de Marta Rivas, Enrique Marschoff y Miguel Petruccelli.

Finalmente agradezco a mis directores, Marcelo y Fabiana, por la confianza y el apoyo brindado.

## INDICE DE CONTENIDOS

<b><u>RESUMEN</u></b>	1-4
<b><u>1. INTRODUCCION</u></b>	<b>5-54</b>
<b>1.1. La Antártida</b>	5
1.1.1. Legislación vigente en la Antártida	6-9
1.1.2. La República Argentina en el Continente Antártico	9-11
1.1.3. Bahía Esperanza	11-14
1.1.4. Aves antárticas	15-19
1.1.5. Antecedentes de enfermedades que afectan a las aves antárticas y subantárticas	19-24
<b>1.2. Cólera Aviar</b>	<b>24</b>
1.2.1. Agente etiológico	25-27
1.2.2. Patogenia de Cólera Aviar	27
1.2.3. Respuesta inmune	28-29
1.2.4. Factores de virulencia de <i>Pasteurella multocida</i>	29-32
1.2.5. Diagnóstico de Cólera Aviar	32-36
1.2.6. Subtipificación de <i>P. multocida</i>	36-46
1.2.7. Epizootiología de Cólera Aviar en aves silvestres	46-52
<b>1.3. Cólera Aviar en aves antárticas y subantárticas</b>	<b>52-53</b>
1.3.1. Mortalidad de aves en Bahía Esperanza	53-54
<b><u>2. OBJETIVOS</u></b>	<b>55-56</b>

<b><u>3. MATERIALES Y METODOS</u></b>	<b>57-72</b>
<b>3.1. Area de estudio</b>	<b>57</b>
3.1.1. Descripción de Bahía Esperanza	57
3.1.2. Análisis de los cuerpos de agua dulce	57-58
3.1.3. Climatología	58
<b>3.2. Vigilancia epizootiológica</b>	<b>58</b>
3.2.1. Población de aves	58-59
3.2.2. Recolección de aves muertas	59-60
<b>3.3. Diagnóstico patológico</b>	<b>60</b>
<b>3.4. Diagnóstico microbiológico</b>	<b>60</b>
3.4.1. Aislamiento de <i>Pasteurella multocida</i>	0-61
3.4.2. Caracterización fenotípica e identificación de los aislamientos de <i>P. multocida</i>	2-63
3.4.3. Susceptibilidad de las cepas de <i>P. multocida</i> a diferentes antimicrobianos	3-64
3.4.4. Subtipificación molecular de las cepas de <i>P. multocida</i>	64-65
3.4.5. Cepas de <i>P. multocida</i> de diferente origen	66
3.4.6. Evaluación de las técnicas de subtipificación	66-67
<b>3.5. Diagnóstico microbiológico diferencial de Cólera Aviar</b>	<b>67</b>
3.5.1. Muestras de aves halladas muertas	67-68
3.5.2. Identificación de <i>Escherichia coli</i>	68-69
3.5.3. Identificación de bacterias productoras de hidrógeno sulfurado	69
3.5.4. Análisis micológico	69-70

3.5.5. Análisis virológico	70
<b>3.6. Procesamiento de la información</b>	<b>71</b>
<b><u>4. RESULTADOS</u></b>	<b>72-98</b>
<b>4.1. Area de estudio</b>	<b>72</b>
4.1.1. Hidrología	72-75
4.1.2. Climatología	75-76
<b>4.2. Vigilancia epizootológica</b>	<b>77</b>
4.2.1. Poblaciones de aves en Bahía Esperanza	77-80
4.2.2. Recolección de aves muertas en Bahía Esperanza	80-81
<b>4.3. Diagnóstico patológico</b>	<b>81</b>
4.3.1. Diagnóstico patológico de las aves halladas muertas en la temporada reproductiva 2000-2001	81-84
4.3.2. Diagnóstico patológico de las aves halladas muertas en la temporada reproductiva 2001-2002	84-85
4.3.3. Diagnóstico patológico de las aves halladas muertas en la temporada reproductiva 2002-2003	85
<b>4.4. Diagnóstico microbiológico</b>	<b>86</b>
4.4.1. Aislamiento de <i>P. multocida</i>	86
4.4.2. Caracterización fenotípica de los aislamientos de <i>P. multocida</i>	86-87
4.4.3. Susceptibilidad de las cepas de <i>P. multocida</i> a diferentes antimicrobianos	87-88



4.4.4. Subtipificación molecular de las cepas de <i>P. multocida</i> aisladas en Bahía Esperanza	88
4.4.5. Cepas de <i>P. multocida</i> de diferente origen	88-92
<b>4.5. Diagnóstico microbiológico diferencial de Cólera Aviar</b>	<b>92</b>
4.5.1. Análisis Bacteriológico	92-93
4.5.2. Análisis micológico	93
4.5.3. Análisis virológico	93
<b>4.6. Procesamiento de la información</b>	<b>94-98</b>
<b><u>5. DISCUSION</u></b>	<b>99-137</b>
<b>5.1. Ambiente</b>	<b>102</b>
5.1.1. Agua	103-105
5.1.2. Variables climáticas	105-106
<b>5.2. Hospedador</b>	<b>106</b>
5.2.1. Especie	108-110
5.2.2. Comportamiento	110-112
5.2.3. Sexo	112
5.2.4. Edad	113
5.2.5. Dieta	113-114
5.3. Agente	114
5.3.1. Caracterización y subtipificación fenotípica	115-120
5.3.2. Subtipificación molecular	120-125
5.3.3. Otros microorganismos	125-127

<b>5.4. Reservorio y transmisión de <i>P. multocida</i> en Bahía Esperanza</b>	<b>127-131</b>
<b>5.5. Otras causas de muerte en las aves de Bahía Esperanza</b>	<b>131</b>
<b>5.6. Control de Cólera Aviar en la Antártida</b>	<b>132-134</b>
<b>5.7. Monitoreo epizootiológico de aves antárticas</b>	<b>134-137</b>
<b><u>6. CONCLUSIONES</u></b>	<b>138-143</b>
<b><u>7. BIBLIOGRAFIA</u></b>	<b>144-169</b>

## **ABREVIATURAS Y SIMBOLOS**

%: porcentaje

(-): sexo no determinado

-: negativo

?: desconocido

+: positivo

μ: micra

μg/ml: microgramo por mililitro

μg: microgramo

μl: microlitro

♀: hembra

♂: macho

<sup>0</sup>/<sub>0000</sub>: por cien mil

ADE: pingüino Adelia

ADN: ácido desoxirribonucleico

AFLP: amplificación de fragmentos polimórficos largos

AIV: aivlosin

AMP: ampicilina

ANLIS: Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud

AR: adulto reproductivo

ARN: ácido ribonucleico

ARNr: ácido ribonucleico ribosomal

ASOC: Coalición del Océano Austral y el Antártico

ATB: antimicrobiano

ATCC: American Type Culture Collection

B: cavidad bucofaríngea

c. a.: Cólera Aviar

CCAMLR: Convención para la Conservación de los Recursos Vivos Marinos Antárticos

CDC: Center for Disease Control and Prevention

CEE: Evaluación Medioambiental Global

CEF: cefalotina

CFT: ceftiofur

CEP: Comité de Protección Ambiental

CIM: concentración inhibitoria mínima

cm: centímetro

CO<sub>2</sub>: Bióxido de carbono

DAEC: *Eacherichia coli* de adherencia difusa

DNA: Dirección Nacional del Antártico

*E. coli*: *Escherichia coli*

*E. tarda*: *Edwardsiella tarda*

EaggEC: *Escherichia coli* enteroagregativo

EE.UU.: Estados Unidos de Norte América

EHEC: *Eacherichia coli* enterohemorrágico

ENR: enrofloxacina

EPEC: *Escherichia coli* enteropatogénico

ERIC-PCR: amplificación de secuencias repetitivas intergénicas de consenso de Enterobacterias

ETEC: *Escherichia coli* enterotoxigénico

FCV: Facultad de Ciencias Veterinarias

FLO: florfenicol

g/l: gramo por litro

g: gramo

GAV: gaviota cocinera

GEN: gentamicina

H: hígado

h: hora

HE: hematoxilina y eosina

I: resistencia intermedia

IAA: Instituto Antártico Argentino

IAATO: Asociación Internacional de Operadores Turísticos Antárticos

IEE: Evaluación Inicial del Medioambiente

INEI: Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas

IUCN: Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza

kb: kilobase

KD: kilo Daltons

kg: kilogramo

km/h: kilómetro por hora

km: kilómetro

km<sup>2</sup>: kilómetro cuadrado

l: litro

LPS: lipopolisacárido

LT: toxina termolábil

m: metro

MEM: Medium Englin Minimum

mg: miligramo

ml: mililitro

MLEE: multilocus enzimático

MLST: tipificación de secuencias multilocus

mm: milímetro

NADC: National Animal Disease Center

NCCLS: Comité Nacional de Estándares para Laboratorio Clínico

ND: no determinado

Nr: adulto no reproductivo

NT: no tipificable

°C: grados centígrados

OD: densidad óptica

ODC: ornitina decarboxilasa

OMP: proteínas de membrana externa

*P. m. gallicida: Pasteurella multocida gallicida*

*P. m. multocida: Pasteurella multocida multocida*

*P. m. septica: Pasteurella multocida septica*

*P. multocida: Pasteurella multocida*

P: pulmón

PAS: ácido periódico Schiff

pb: pares de bases

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PFGE: electroforesis en campos pulsados

Pi: pichón

PMSA: agar selectivo para el aislamiento de *P. multocida*

PSL: proteína de membrana externa P6-like

R: resistente

RAPD-PCR: amplificación de secuencias de ADN al azar dentro del genoma bacteriano

REA: análisis con endonucleasas de restricción

Rep-PCR: amplificación de secuencias de ADN repetitivo dentro del genoma bacteriano

S: susceptible

SCAR: Comités Científicos de Investigaciones Antárticas

seg: segundos

SENASA-DILACOT: Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. Dirección de Laboratorios de Control Técnico.

SK: skua

spp.: especies

ST: toxina termoestable

STEC: de *E. coli* productor de toxina Shiga

STR: estreptomicina

*T. microsporus*: *Thelebolus microsporus*

TET: tetraciclina

TIA: tiamulina

TIL: tilosina

TNF: factor de necrosis tumoral

U: unidades

UNLP: Universidad Nacional de La Plata

UPGMA: Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean

w: reacción de inmunodifusión débil

WCP: proteínas celulares totales

X<sup>2</sup>: Chi cuadrado



## **1. INTRODUCCION**

### **1.1. LA ANTARTIDA**

El Continente Antártico se encuentra ubicado en el polo sur del planeta, y para realizar una somera descripción geográfica, se lo puede dividir en 2 grandes regiones, una continental (14.000.000 km<sup>2</sup>) y la otra insular (39.000.000 km<sup>2</sup>) que incluye las islas y los mares congelados que lo rodean. La gran cobertura de hielo hace de la Antártida el Continente con mayor altura, 2.000 m sobre el nivel del mar. Las condiciones climáticas son desfavorables para la vida animal y vegetal, la temperatura mínima registrada fue de -88,5°C, las ráfagas de viento superan los 200 km/h, y la forma predominante de precipitación es la nieve.

La situación de aislamiento que presenta la Antártida con respecto a los otros Continentes es única. Un cinturón de mares profundos interpone distancias de 1.000 km con América y hasta 3.600 km con Africa. Tal separación es una barrera prácticamente infranqueable y explica la ausencia de vertebrados terrestres, a excepción de mamíferos marinos y algunas especies de aves migratorias vinculadas al mar.

En las costas antárticas, durante los meses de verano, habitan aves y mamíferos de adaptación acuática. En el zooplancton marino de las aguas antárticas predominan el krill y los copépodos, además de otros crustáceos, larvas de peces, moluscos, salpas y diversos organismos gelatinosos. El krill es el principal componente de la cadena trófica y la especie más abundante es *Euphausia superba*. La fauna presente en el ambiente continental se reduce a algunos invertebrados (artrópodos, insectos y arácnidos), mientras que la flora está representada por más de 150 especies de líquenes, 75 especies de musgos, una especie de gramínea (*Deschampsia antarctica*) y el menos frecuente clavel antártico (*Colobanthus quietensis*) (de la Vega, 2000).

La presencia humana en la Antártida se remonta a la segunda década del siglo XIX con la llegada de los primeros exploradores, balleneros y focueros. Con estas expediciones comenzaron a desarrollarse investigaciones tendientes a conocer los componentes de uno de los pocos ecosistemas a los que el hombre no había tenido acceso.

A medida que los avances tecnológicos posibilitaron mayores facilidades, la investigación y su logística asociada aumentó, alcanzando en la actualidad casi medio centenar de países que desarrollan actividades en la Antártida. Si bien a lo largo del siglo pasado se emprendieron numerosos trabajos científicos en diversas disciplinas, solo desde hace pocos años el hombre comenzó a plantearse el estudio y la preservación del medio ambiente antártico como una línea de prioridad. En las últimas décadas, la comunidad científica internacional reconoció la necesidad de reducir el nivel de deterioro global ocasionado por el hombre. Uno de los puntos más importantes que se aconseja considerar es la manutención de las áreas poco alteradas con la menor intervención antrópica posible. Entre estas áreas la Antártida ocupa un lugar de privilegio (Acero et al., 2001).

### **1.1.1. LEGISLACION VIGENTE EN LA ANTARTIDA**

- **El Tratado Antártico**

El Tratado Antártico ([www.opanal/NWFZ/Antartico/antartico\\_sp.pdf](http://www.opanal/NWFZ/Antartico/antartico_sp.pdf)) fue firmado en Washington el 1° de diciembre de 1959 y la Nación Argentina, firmante primaria del documento, lo ratificó en su totalidad mediante la ley 15.802 sancionada el 26 de abril de 1961. Dos meses más tarde fue ratificado por todos los países signatarios. El Tratado Antártico entró en plena vigencia el 23 de junio de 1961, instaurando un nuevo espacio polar situado al sur de los 60° S, espacio que desde entonces es utilizado exclusivamente con fines pacíficos.

Cuando el Tratado Antártico entró en vigencia, se establecieron pautas fundamentales para que el impacto derivado de la presencia humana en la Antártida fuera mínimo.

Durante la década de 1960, estas inquietudes se reflejaron en numerosas recomendaciones tendientes a la conservación, no solo del medio ambiente, sino también de sus recursos naturales. Estas pautas de comportamiento, acordadas y ratificadas por todos los países miembros del Tratado, son las leyes que actualmente rigen en la Antártida.

- **Convención para la Protección de la Flora y la Fauna Antártica**

En 1964, la Convención para la Protección de la Flora y la Fauna Antártica constituyó el primer ámbito que proveyó una serie de definiciones fundamentales sobre la protección y conservación del medio ambiente antártico. En este contexto se definió al Area del Tratado Antártico como un Area Especial de Conservación. Entre los puntos salientes de la misma se definen figuras tales como las de Areas Especialmente Protegidas, Sitios de Especial Interés Científico y Especies Protegidas.

- **Convención para la Conservación de los Recursos Vivos Marinos Antárticos**

En 1980, se estableció el acuerdo denominado Convención para la Conservación de los Recursos Vivos Marinos Antárticos (CCAMLR) ([www.ccamlr.org](http://www.ccamlr.org)). Este acuerdo, del que también es parte signataria original la República Argentina, se aplica a todos los recursos vivos marinos de la Antártida, incluidas las aves que se encuentran al sur de la Convergencia Antártica.

- **Protocolo de Madrid**

En 1991, se firmó el Protocolo al Tratado Antártico sobre la Protección del Medio Ambiente (Protocolo de Madrid) ([www.conama.cl/portal/1255/fo-article-26075.pdf](http://www.conama.cl/portal/1255/fo-article-26075.pdf)) que complementa y refuerza al Tratado Antártico para garantizar que la Antártida siga utilizándose exclusivamente

con fines pacíficos y científicos, y que no se convierta en escenario u objeto de discordia internacional. El Protocolo reconoce las oportunidades únicas que ofrece la Antártida para la observación científica y la investigación de procesos de alcance global y regional. De esta manera, el Protocolo de Madrid designa a la Antártida como “reserva natural consagrada a la paz y a la ciencia”. Los principios medio ambientales sobre los cuales se apoya el Protocolo están contenidos en el Artículo 3. Dichos principios enuncian la necesidad de protección de los valores naturales y científicos de la Antártida. Para ello, en el Protocolo se destaca la obligación de realizar una planificación cuidadosa de las actividades antárticas, de modo de evitar o atenuar los impactos perjudiciales sobre el medio ambiente. Asimismo, en el Protocolo se establece la necesidad de elaborar evaluaciones previas de tales impactos, así como actividades de monitoreo constante. Cinco anexos forman parte integrante del Protocolo:

- I. Evaluación del Impacto sobre el Medio Ambiente
- II. Conservación de la Fauna y la Flora Antártica.
- III. Eliminación y Tratamiento de Residuos.
- IV. Prevención de la Contaminación Marina.
- V. Protección y Gestión de Zonas.

El Protocolo de Madrid entró en vigencia el 14 de enero de 1998, una vez que fue ratificado por todas las Partes Consultivas del Tratado Antártico. Nuestro país aprobó el Protocolo mediante la Ley Nacional 24.216, del 19 de mayo de 1993. Es importante señalar que está en proceso de estudio un sexto Anexo al Protocolo, que se refiere a la Responsabilidad por Daño Ambiental, por el cual cada Parte deberá responder económicamente por las consecuencias ambientales de sus actividades.

Para el cumplimiento de los objetivos del Protocolo de Madrid se creó el Comité de Protección Ambiental (CEP) ([www.cep.aq/MediaLibrary/asset/MediaItems](http://www.cep.aq/MediaLibrary/asset/MediaItems)), cuyas funciones consisten en proporcionar asesoramiento y formular recomendaciones a la Reunión Consultiva del Tratado Antártico. En sus sesiones el CEP cuenta con la presencia de todas las Partes del Tratado Antártico, los presidentes de los Comités Científicos de Investigaciones Antárticas (SCAR) ([www.scar.org](http://www.scar.org)) y de la CCAMLR ([www.caamlr.org](http://www.caamlr.org)), así como de representantes de organizaciones no gubernamentales, relacionadas con la actividad antártica, tales como la Asociación Internacional de Operadores Turísticos Antárticos (IAATO) ([www.iaato.org](http://www.iaato.org)), la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN) ([www.iucn.org](http://www.iucn.org)) y la Coalición del Océano Austral y el Antártico (ASOC) ([www.asoc.org](http://www.asoc.org)), quienes participan en el CEP en calidad de observadores.

Entre las principales pautas de protección ambiental contenidas en el Protocolo de Madrid se encuentra la Conservación de la Flora y la Fauna (Artículos 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4 y 6.2, Apéndices A, B y C del Anexo II). El Protocolo de Madrid establece una serie de restricciones respecto a la toma e intromisión perjudicial de especies antárticas, como así también respecto a la introducción de especies no autóctonas, dado que estas acciones pueden representar una amenaza para la flora y la fauna antártica.

El Artículo 4 del Anexo II del Protocolo de Madrid se refiere a la “introducción de especies, parásitos y enfermedades no autóctonas” y prohíbe la introducción de especies animales no autóctonas como por ejemplo perros. Asimismo, esta prohibido ingresar animales vivos con fines alimenticios. Inclusive, cada Parte debe solicitar que se tomen precauciones para impedir la introducción de microorganismos como virus, bacterias, parásitos, y hongos ausentes en la fauna y la flora nativa.

### **1.1.3. LA REPUBLICA ARGENTINA EN EL CONTINENTE ANTARTICO**

La presencia continua de la República Argentina en la Antártida se inició en el año 1904, fecha en que se inauguró la Base Orcadas en la Isla Laurie, Islas Orcadas del Sur, siendo la única que desde entonces funciona permanentemente en la región. Este hito histórico, sin precedentes en el mundo coloca a la Argentina como un país de reconocida tradición antártica.

Desde el establecimiento de la Base Orcadas hasta la actualidad, se estimularon y coordinaron diversos proyectos científicos destinados a incrementar el conocimiento relacionado con el Continente Antártico. Se instalaron 16 Bases Científicas, de las cuales 6 operan durante todo el año, y numerosos refugios. Asimismo, Argentina cuenta con una operatividad logística que permite realizar las campañas antárticas que se programan en función de la actividad científica, de interés prioritario para el país.

En la República Argentina, la Dirección Nacional del Antártico (DNA) ([www.dna.gov.ar](http://www.dna.gov.ar)) estableció un Procedimiento Nacional apropiado para que cada actividad a desarrollarse en la Antártida sea evaluada considerando el posible impacto sobre el medio ambiente antártico y los ecosistemas dependientes y asociados. Este procedimiento consiste en que los responsables de las actividades desarrolladas en la Antártida, informen a la DNA sobre sus aspectos más relevantes, de acuerdo con lo establecido por el Protocolo de Madrid. A partir de tal información, la DNA elabora evaluaciones de Impacto Ambiental en cada actividad y considera el otorgamiento de diferentes permisos. Si la evaluación preliminar de una actividad a desarrollarse en el Area del Tratado Antártico determina que ésta puede causar un impacto menor o transitorio sobre el medio ambiente se realizará una Evaluación Inicial del Medioambiente (IEE). Si a través de una IEE se determina que una actividad a desarrollarse en el Area del Tratado Antártico puede tener un

impacto mayor que mínimo o transitorio, se realiza una Evaluación Medioambiental Global (CEE).

La DNA, a través del Ministerio de Relaciones Exteriores, Comercio Internacional y Culto, comunicará la realización de evaluaciones IEE o CEE, conforme a los requisitos especificados en el Artículo 3, inciso 3 y en el Artículo 6 del Anexo I del Protocolo de Madrid (Acero et al., 2001).

### **1.1.3. BAHIA ESPERANZA**

Bahía Esperanza (63° 24'S, 56° 59'O), se encuentra en el extremo Noreste de la Península Antártica, sobre el margen occidental del estrecho Antarctic, el cual la separa de las Islas Durville, Joinville y Dundee (Figuras 1a y 1b). Bahía Esperanza posee un ancho máximo de 3 km y una longitud aproximada de 5 km. La costa Norte de la Bahía presenta un diseño formado por paredes glaciarias que penetran verticalmente en el mar. La costa Sur posee en su mayor parte una pendiente abrupta de derrubios, terminando en una estrecha franja intermareal con un ancho promedio no mayor a 10 m (Acero et al., 1996).

Durante la época estival, el área total libre de hielo desde la costa de la Bahía hasta las laderas del Monte Flora es de aproximadamente 4 km<sup>2</sup>. En el centro de la costa Sur se forma una pequeña Península (Península Esperanza), definida por la Caleta Chozas hacia el Este y la Caleta Aguila hacia el Oeste (Figura 2)

El paisaje es producto de la acción de 3 agentes principales: glaciario, fluvial, y remoción en masa. Se presentan profundos valles en “U” rellenos con sedimentos arrastrados por el hielo y formando morenas frontales y laterales. La acción fluvial se intensifica con el aumento de la temperatura, poniendo en movimiento o incrementando cursos de agua con alto poder erosivo,

mientras que la remoción en masa ocasiona acumulación de rocas en los lugares bajos debido a la inestabilidad de las pendientes.

El margen Sudoeste de Bahía Esperanza se caracteriza por la presencia de numerosos cuerpos de agua dulce, cuya fuente principal de alimentación proviene de las aguas de fusión glaciaria en la época estival. Los cuerpos de agua dulce están representados por: a) lagos permanentes, que no se congelan en el fondo y generalmente están libres de hielo en verano; b) estanques que se congelan totalmente durante el invierno y pueden presentar una cubierta de hielo durante el verano; c) charcas temporarias que se caracterizan por presentar escasa profundidad, por congelarse totalmente en invierno y por ser inconstantes de un año a otro, según las variaciones geomorfológicas; y d) chorrillos de deshielo, presentes en los meses de primavera y verano, cuyo caudal y recorrido varían según las condiciones climáticas y las características geomorfológicas (Izaguirre et al., 1998).

La situación geográfica de Bahía Esperanza y sus características topográficas le confieren un riguroso clima marítimo, frío y húmedo. De acuerdo a las mediciones del Servicio Meteorológico Nacional se observa que la región es barrida por vientos de una intensidad media de 40 km/h y frecuentes ráfagas de hasta 180 km/h. Las temperaturas oscilan entre -30°C y 10°C en valores absolutos y los valores medios son inferiores a 1°C en la totalidad de los meses del año. Excepto algunos días del año las precipitaciones son sólidas (Acero et al., 1996).

Durante los meses de primavera y verano en esta Bahía nidifican las siguientes especies de aves: pingüino Adelia (*Pygoscelis adeliae*), pingüino papua (*Pygoscelis papua*), gaviota cocinera (*Larus dominicanus*), skua (*Catharacta* sp.), paloma antártica (*Chionis alba*), gaviotín antártico (*Sterna vitata*) y petrel de Wilson (*Oceanites oceanicus*). Ocasionalmente se pueden observar ejemplares de petrel gigante del sur (*Macronectes giganteus*) y cormorán antártico



(*Phalacrocorax bransfieldensis*) (Coria y Montalti, 1993) (Figura 3). La colonia reproductiva de pingüinos Adelia es muy importante y presenta una población del orden de 124.000 parejas (Myrcha et al., 1987) (Figura 4). Esta colonia provee una gran cantidad de alimento a las palomas, gaviotas y skuas que nidifican en la zona y a los ejemplares no reproductivos que se agrupan en torno a los cuerpos de agua dulce originados por el deshielo. Al finalizar el verano los pingüinos migran, con lo cual disminuye el principal aporte alimenticio de las aves predatoras y carroñeras. Durante los meses de otoño e invierno el terreno se cubre de nieve, los cuerpos de agua dulce se congelan, como así también el mar que circunda a la Bahía, obligando a las aves voladoras a buscar zonas de mar abierto para abastecerse de alimento.

No existen asentamientos de mamíferos marinos y solo se pueden observar individuos solitarios de foca de Weddell (*Leptonichotes weddelli*), foca cangrejera (*Lobodon carcinophagus*), lobo fino antártico (*Arctocephalus gazella*) y elefante marino (*Mirounga leonina*) descansando en las playas de punta Foca y en la costa Este de Caleta Choza. También es posible observar leopardos marinos (*Hydrurga leptonyx*) cazando pingüinos en Caleta Aguila.

En Bahía Esperanza existen muy pocas zonas capaces de proporcionar condiciones micro-ambientales favorables para el desarrollo de vegetación. La vegetación terrestre está representada por líquenes crustosos que tapizan la superficie de las rocas y en menor medida por briofitas del Género *Politrychum* en sitios reparados. En asociación con lugares inundables o de deficiente drenaje se encontró *Prasiola crispa*, un alga terrestre.

### **Presencia humana en Bahía Esperanza**

En 1902, luego del hundimiento del buque Antarctic, 3 integrantes de la expedición sueca dirigida por el Dr. Otto Nordenskjöld sobrevivieron durante más de un año en un precario refugio construido en Bahía Esperanza. Durante su angustiosa estadía en el lugar, estos hombres

recolectaron fósiles de vegetales en el Monte Flora, mediante los cuales se demostró que hace más de 100 millones de años el ecosistema antártico presentaba características de selva tropical. Cuarenta años después de esa histórica epopeya, se construyeron 2 refugios en el área, uno en la costa Este de la Bahía (Inglaterra), y otro en la Península Esperanza (Argentina). El refugio inglés se incendió en 1948 y posteriormente fue reconstruido en la zona Noreste del Lago Boeckella, denominándose “Trinity House”. En la actualidad, el refugio Trinity es utilizado solamente durante los meses de verano por la República Oriental del Uruguay, y por lo tanto las actividades desarrolladas en sus instalaciones provocan un impacto ambiental menor que el ocasionado por la Base Esperanza.

A partir del año 1953, el Ejército Argentino comenzó la construcción de la Base Esperanza, ocupando el territorio en forma progresiva. La Base alcanzó su tamaño actual hacia fines de la década de 1970 y desde entonces es una de las 6 Bases Argentinas que opera durante todo el año. En la actualidad la Base cuenta con 38 edificios que cubren una superficie aproximada de 3.000 m<sup>2</sup> y una superficie modificada de 11 hectáreas (Figura 5).

Las instalaciones tienen capacidad para alojar a 100 personas durante el verano, y a 50 durante el invierno. La energía eléctrica es provista por una usina principal con 2 motores de uso alternado y una usina de emergencia. La provisión de agua potable se realiza mediante una toma en el Lago Boeckella, que previa filtración es distribuida a las instalaciones de la Base. Las aguas servidas son maceradas y eliminadas al mar mediante un sistema de bombeo a través de una red cloacal.

En la actualidad los residuos sólidos y líquidos no cloacales son transportados fuera de la zona del Tratado Antártico, de acuerdo a las normas de tratamiento de desechos existentes.

La carga de aprovisionamiento es transportada cada verano por el rompehielos A.R.A.

“Almirante Irizar”, descargándose a tierra mediante el uso de helicópteros. Además, desde la Base Vicecomodoro Marambio se brinda apoyo logístico, proporcionando el transporte de personal, carga y correo, mediante la utilización de aviones Twin-Otter que anevizan en el glaciar Esperanza (Acero et al., 1996).

#### **1.1.4. AVES ANTARTICAS**

La diversidad de aves que nidifican en la Antártida es baja y está representada por 4 Ordenes: *Sphenisciformes*, *Procellariiformes*, *Pelecaniformes*, y *Charadriiformes*.

- **Orden *Sphenisciformes***

Los pingüinos pertenecen al Orden *Sphenisciformes*. Este es el único Orden de aves en el cual todas sus especies son marinas y perdieron la capacidad de vuelo. El origen del Orden *Sphenisciforme* se remonta al Paleoceno y desciende de ancestros voladores. Si bien en el pasado este Orden tuvo una gran diversidad, ya que se reconocieron más de 30 especies extintas, en la actualidad existe una sola Familia *Spheniscidae* que agrupa a 17 especies de pingüinos, de las cuales 7 nidifican al sur de los 60° S.

Los pingüinos son aves típicas y exclusivas de mares templados y fríos del hemisferio sur, y las especies con poblaciones más numerosas se encuentran en aguas antárticas y subantárticas. Todas las especies son similares tanto en su conformación anatómica como en su coloración y no presentan dimorfismo sexual, sin embargo su tamaño varía considerablemente. Existen especies como el pingüino enano (*Eudyptula minor*) que habita en Australia y Nueva Zelanda que mide 40 cm y especies como el pingüino emperador (*Aptenodytes forsteri*) restringido a la Antártida que posee una altura de 115 cm y pesa 30 kg. Entre las características estructurales más destacadas se puede mencionar que poseen un cuerpo hidrodinámico, una densa cubierta de plumas y que las alas están modificadas en forma de aletas.

Los pingüinos solo arriban a las costas a reproducirse y a mudar su plumaje. Son especies sociales y gregarias, nidifican en colonias densas, las cuales pueden comprender entre cientos y millones de individuos. El período reproductivo presenta una duración aproximada de 6 meses, ponen 2 huevos que son incubados por ambos sexos. La dieta de los pingüinos antárticos está compuesta principalmente por krill (*Euphausia* spp.) y otras especies de eufausidos como *Thysanoessa macrura*, y en menor proporción por cefalópodos y peces.

Las especies de pingüinos que más abundan en el extremo noreste de la Península Antártica, Islas Shetland del Sur e Islas Orcadas del Sur son: pingüino Adelia (*Pygoscelis adeliae*), pingüino barbijo (*Pygoscelis antarctica*) y pingüino papua (*Pygoscelis papua*) (Soave et al., 2003).

- **Orden *Procellariiformes***

El Orden *Procellariiformes* es uno de los Ordenes más antiguos entre de las aves, ya que su origen se remonta al Eoceno. Este Orden presenta 4 Familias: *Procellariidae*, *Diomedidae*, *Hydrobatidae* y *Pelecanoididae*.

El Orden *Procellariiformes* presenta una gran diversidad de especies. En la Antártida y Subantártida se encuentran 17 especies, como por ejemplo el albatros de ceja negra (*Diomedea melanophris*), albatros errante (*Diomedea exulans*), petrel gigante del sur (*Macronectes giganteus*), petrel damero (*Daption capense*), petrel de las nieves (*Pagodroma nivea*) y petrel de Wilson (*Oceanites oceanicus*).

Una de las características anatómicas más destacable de este Orden es la morfología de su pico, el cual está formado por placas corneas que en algunas Familias como *Procellariidae* presenta forma de tubo en la cual desembocan las narinas. Se destacan también el desarrollo de glándulas supraorbitales y patas palmadas. Las aves de este Orden presentan una gran variación

de tamaño, desde 30 cm y 50 g de peso como el petrel de Wilson, hasta 3,5 m de envergadura y 12 kg de peso como el albatros errante. Al igual que los pingüinos no presentan dimorfismo sexual.

Los *Procellariiformes* son aves marinas pelágicas que solo van a la costa a reproducirse. Obtienen su alimento del mar y utilizan diferentes técnicas para alimentarse, muchas especies se alimentan de carroña, desechos de barcos y cleptoparasitismo. En general forman colonias reproductivas y ponen un solo huevo que es incubado por ambos sexos (Soave et al., 2003).

- **Orden *Pelecaniformes***

Los *Pelecaniformes* constituyen un antiguo grupo que se originó a finales del Eoceno. Se los divide en 6 Familias: *Phaethontidae*, *Pelecanidae*, *Sulidae*, *Phalacrocoracidae*, *Anhingidae* y *Fregatidae*.

Estas aves se encuentran vinculadas al agua y la distribución del Orden es cosmopolita, aunque la única Familia que se encuentra en la Antártida es *Phalacrocoracidae*, con un solo representante, el cormorán antártico. Esta especie nidifica en las Islas Shetland del Sur y en la Península Antártica. Fenotípicamente no presentan dimorfismo sexual y los principales integrantes de su dieta son peces y crustáceos. Los cormoranes forman colonias reproductivas muy densas en peñones de difícil acceso y ponen 3 huevos que son incubados por ambos sexos (Soave et al., 2003).

- **Orden *Charadriiformes***

El Orden *Charadriiformes* se divide en 3 Subórdenes: *Alcae*, *Charadrii* y *Lari*.

El suborden *Alcae* está representado por la Familia *Alcididae*, que no presenta especies que nidifican en la Antártida.

El Suborden *Charadrii* agrupa 12 Familias, de las cuales solo una especie de la Familia *Chionidae* nidifica en la Antártida, la paloma antártica.

El Suborden *Lari* está formado por 4 Familias: *Stercorariidae*, *Laridae*, *Sternidae* y *Rynchopidae*. En la Antártida nidifican especies de las 2 primeras Familias: skua pardo (*Catharacta antarctica lonnbergi*), skua polar del sur (*Catharacta maccormicki*), gaviota cocinera y gaviotín antártico (*Sterna vitata*).

La Familia *Chionidae* es exclusiva del hemisferio sur y comprende un Género: *Chionis* y 2 especies: *alba* y *minor*. *Chionis alba* nidifica desde la Antártida e Islas Subantárticas del Océano Atlántico hasta las costas del Mar Argentino, Uruguay y Brasil. *Chionis minor* nidifica en las Islas Kerguelen e Islas Subantárticas del Océano Indico. No realizan largas migraciones como otras especies del Orden *Charadrii*. Generalmente se asocian a las colonias reproductivas de otras aves. Se las puede observar solas o en pequeños grupos, son curiosas y muy caminadoras. No poseen dimorfismo sexual y se alimentan de carroña, huevos, pichones, moluscos y crustáceos. También cleptoparasita en las colonias de pingüinos y mamíferos marinos. Construyen el nido entre las rocas y ponen 3 huevos.

La Familia *Stercorariidae* proviene de la Familia *Laridae*, de una divergencia que ocurrió hace 10 millones de años en los finales del Mioceno. La Familia *Stercorariidae* es de distribución cosmopolita y comprende aves denominadas skuas, de las cuales existen 7 especies en todo el mundo. Dos de estas especies nidifican en la Antártida, el skua pardo y el skua polar del sur. El skua pardo es una especie circumpolar antártica y subantártica, se distribuye y nidifica alopátricamente a lo largo de las Islas del Arco de Scotia y de la Península Antártica hasta los 65° S. Se alimenta de huevos y pichones de pingüinos o de adultos de pequeños *Procellariiformes*. También comen carroña, peces y crustáceos. El skua polar del sur se

reproduce en el Continente Antártico extendiendo su distribución hacia el norte de la Península Antártica y las Islas Orcadas del Sur. Se alimenta de peces, y preda huevos y pichones de pingüinos. Sus rutas migratorias son muy variadas pudiendo llegar en el invierno polar austral hasta las Islas Aleutianas y las costas de Norteamérica. Las 2 especies de skua defienden sus territorios de nidificación y alimentación, cercanos a las colonias de pingüinos, y nidifican simpátricamente en pocas áreas de la Península Antártica e Islas Subantárticas. Ambas especies ponen 2 huevos por temporada y ninguna presenta dimorfismo sexual.

La Familia *Laridae* comprende 2 Subfamilias: *Larinae* (gaviotas) y *Sterninae* (gaviotines). Son cosmopolitas desde el Artico hasta la Antártida, con representantes en todas las regiones. En la Antártida nidifican la gaviota cocinera y el gaviotín antártico.

En los últimos 20 años el área de distribución de la gaviota cocinera aumentó, abarcando en la actualidad las costas de Sudamérica, Islas del Atlántico Sur, Islas del Pacífico Sur, Islas Subantárticas y Antártida. Estas aves forman colonias de nidificación en el mismo sitio durante varias temporadas reproductivas y habitualmente crían entre 2 y 3 pichones. En Sudamérica, las gaviotas cocineras se encuentran asociadas a basurales, zonas portuarias y áreas agropecuarias (Figura 6). En la Antártida su dieta está compuesta por moluscos, peces, crustáceos y carroña. (Montalti et al., 2003).

El gaviotín antártico es un ave no migratoria que reside en la Antártida y se alimenta principalmente de krill, aunque en verano también captura peces como el *Pleuragramma antarcticum*. Forma grandes colonias reproductivas y ponen entre 1 y 2 huevos. Esta especie es muy susceptible a la presencia humana (Montalti et al., 2003).

### **1.1.5. ANTECEDENTES DE ENFERMEDADES QUE AFECTAN A LAS AVES ANTÁRTICAS Y SUBANTÁRTICAS**

El conocimiento de las enfermedades infecciosas que afectan a las aves antárticas es escaso y más aún los trabajos en los que se describe el aislamiento de agentes infecciosos vinculados con la muerte de aves antárticas y subantárticas (Kerry et al., 1999).

La confluencia de los océanos alrededor del Continente Antártico forma una barrera natural que solo puede ser atravesada por algunas especies de aves migratorias, limitando de esta manera el contacto con agentes infecciosos e imposibilitando la introducción de vectores u hospedadores intermediarios. Estas condiciones pueden proteger a las aves antárticas de contraer enfermedades de amplia distribución mundial. Sin embargo, la baja incidencia de enfermedades citadas no significa que las aves antárticas estén libres de ellas. Probablemente los microorganismos capaces de causar enfermedad estén presentes en las poblaciones de aves pero su expresión no se observó con frecuencia. Las aves que nidifican en la Antártida pueden portar determinados agentes infecciosos adquiridos en sus rutas migratorias y no manifestar signos de enfermedad, aunque es posible que enfermen y mueran bajo determinados factores predisponentes (Kerry et al., 1999).

La velocidad del transporte moderno a la Antártida sumado al número de visitantes que arriba a la región polar del sur aumentó considerablemente y estos cambios pueden incrementar la introducción de enfermedades (Mortimer, 1999). Debido a la escasa información acerca de los patógenos que afectan a las aves antárticas, es muy difícil determinar el origen de las enfermedades, y si estas son endémicas o introducidas a expensas del hombre.

En la República Argentina entre los años 1999 y 2003 se realizaron 5 campañas antárticas destinadas al estudio de las enfermedades que afectan a las aves antárticas, mediante las cuales



se obtuvieron importantes resultados (Leotta et al., 1998; 2000; 2001; 2002; 2003; Vigo et al., 2001; Reinoso et al., 2002; Unzaga et al., 2002; Baumeister et al., 2004; de Hoog et al., 2005). Dichos estudios se realizaron a través del Convenio firmado entre el Instituto Antártico Argentino (IAA) y la Universidad Nacional de La Plata (UNLP).

#### **1.1.5.1. Evidencia de posibles enfermedades infecciosas en aves antárticas**

Mediante la detección de anticuerpos, la detección de ADN de microorganismos infecciosos y el aislamiento de bacterias potencialmente patógenas, se pudo evidenciar que las poblaciones de aves antárticas estuvieron expuestas a distintos agentes infecciosos.

##### ***a) Evidencia serológica de enfermedades infecciosas en aves antárticas***

Mediante estudios serológicos se demostró que las aves antárticas estuvieron expuestas a una variedad de microorganismos, y que generaron una respuesta humoral similar o igual a la producida por los agentes etiológicos de algunas enfermedades infecciosas conocidas. Mediante la detección de anticuerpos se sugirió que las aves antárticas y subantárticas pudieron padecer enfermedades infecciosas y se recuperaron.

A continuación se mencionan los trabajos en los que se demostró la presencia de anticuerpos contra microorganismos y enfermedades infecciosas en aves antárticas y subantárticas.

- *Chlamydia* spp. en pingüino emperador y pingüino rockhopper (Cameron, 1968).
- *Chlamydia* spp. en pingüino papua y pingüino rey (*Aptenodytes patagonica*) (Moore y Cameron, 1969).
- Paramixovirus en pingüino Adelia y pingüino rey (Morgan et al., 1978).

- Paramixovirus, Influenza y Enfermedad de Newcastle en pingüino Adelia y pingüino emperador (Morgan y Westbury, 1981).
- Influenza A, en pingüino Adelia (Austin y Webster, 1993).
- Enfermedad Infecciosa Bursal, en pingüino Adelia (Gardner et al., 1997).
- *Borrelia burgdorferi* en pingüino rey (Gauthier-Clerc et al., 1999).
- *Toxoplasma gondii* en pingüino Adelia y petrel gigante del sur (Unzaga et al., 2002).
- Influenza A, en pingüino Adelia, pingüino barbijo, pingüino papua, skua y petrel gigante del sur (Baumeister et al., 2004).

***b) Detección de ADN de agentes infecciosos***

Actualmente es posible determinar la presencia de un agente infeccioso en las aves mediante la detección de su ADN. Hasta el presente se realizó un solo trabajo de estas características, mediante el cual se detectó ADN de *Chlamydia abortus* en muestras obtenidas de skuas (Herrman et al., 2000).

***c) Aislamiento de bacterias potencialmente patógenas para las aves antárticas***

En algunos trabajos se intentó demostrar la presencia de bacterias potencialmente patógenas para las aves antárticas, y por ende el rol de las aves migratorias como posibles reservorios de estas bacterias. A continuación se mencionan los trabajos en los que se aislaron bacterias potencialmente patógenas para las aves antárticas y subantárticas.

- Cinco serovares de *Salmonella* en pingüinos Adelia (Oelke y Steinger, 1973).
- *Salmonella* Enteritidis en un pingüino papua (Olsen et al., 1996).
- *Campylobacter jejuni* en pingüinos macaroni (*Eudyptes chrysolophus*) (Broman et al., 2000).

- *Salmonella* Enteritidis en albatros de ceja negra (*Diomedea chlororhynchos*) (Palmgren et al., 2000).
- *Campylobacter lari* biotipo I en skua y gaviota cocinera, y *C. lari* biotipo II en pingüino Adelia (Leotta et al., 2001).
- *Edwardsiella tarda* en pingüino Adelia, pingüino papua, petrel gigante del sur, skua, paloma antártica, gaviota cocinera, huevos infértiles de pingüino Adelia y carcacas de pingüinos Adelia (Leotta et al., 2001).
- *Salmonella* Enteritidis y *Salmonella* Newport en una población de petrel gigante del sur (Vigo et al., 2001).

***d) Enfermedades parasitarias y fúngicas en aves antárticas***

En la Antártida se pudieron diagnosticar algunas enfermedades parasitarias que afectan a las aves. Sin embargo, la mayoría de las enfermedades parasitarias y fúngicas en aves antárticas se describieron en ejemplares cautivos.

A continuación se mencionan los trabajos en los que se describieron enfermedades de origen parasitario y fúngico en aves antárticas y subantárticas.

- Mucormicosis osteolítica en pingüinos cautivos (Bigland et al., 1961).
- Micosis del tracto respiratorio de los pingüinos cautivos (Appleby, 1962).
- Garrapatas, piojos y pulgas en pingüinos antárticos y subantárticos (Murray, 1964).
- Nematodes en pingüinos antárticos (Schmidt, 1965).
- Aspergilosis en pingüinos papua cautivos (Flach et al., 1990).
- Cestodes en aves marinas (Prudhoe, 1969).
- Cestodes en pingüinos antárticos (Morgan et al., 1978).

- *Plasmodium* spp. en pingüinos cautivos (Stoskopf y Beier, 1979).
- *Aspergillus fumigatus* y *Aspergillus flavus* como agentes patógenos secundarios en pingüinos cautivos (Stoskopf y Beall, 1980).
- Nematodos, Acantocéfalos y Cestodes en aves antárticas (Zdzitowiecki y Drodz, 1980).

#### **1.1.5.2. Mortalidad de aves antárticas y subantárticas**

Las tasas de incidencia y prevalencia de las enfermedades que afectan a las poblaciones de aves antárticas y subantárticas son difíciles de obtener, ya que dependen de la capacidad diagnóstica de los investigadores interesados y de la notificación de los casos (Kerry et al., 1999). Si bien se registraron algunas mortalidades de aves en la Antártida e Islas Subantárticas, en la mayoría de los episodios no se pudo arribar a un diagnóstico definitivo, ya que los datos existentes se deben a unos pocos y casuales hallazgos de animales muertos.

A continuación se detallan las mortalidades registradas en aves antárticas y subantárticas, en orden cronológico.

- 1965. Mortalidad de 37 palomas antárticas en Factory Cove, Isla Signy, Islas Orcadas del Sur. No se determinó la causa (Howie et al., 1968).
- 1971. Mortalidad masiva de pingüinos papua en la Isla Signy, Islas Orcadas del Sur. Mortandad causada aparentemente por Pufinosis (MacDonald y Conroy, 1971).
- 1972. Mortalidad masiva de pichones de pingüinos Adelia en las cercanías de la Estación Mawson (Australia). No se determinó la causa (Kerry et al., 1999).
- 1978. Brote de Cólera Aviar en skuas pardos en la Isla Litchfield, en las cercanías de la Estación Palmer (USA) causado por *Pasteurella multocida* (Parmelee et al., 1979).

- 1981. Mortalidad del 90% de la población de skuas pardos en Bahía del Almirantazgo, Isla 25 de Mayo, Islas Shetland del Sur. No se determinó la causa (Trivelpiece et al., 1981).
- 1981. Mortalidad de 12 skuas en Bahía Esperanza, Península Antártica. No se determinó la causa (Montalti et al., 1996).
- 1986. Mortalidad de pingüinos rockhopper (*Eudyptes chrysocome*) en la Isla Campbell asociada a *P. multocida* (de Lisle et al., 1990).
- 1990. Mortalidad de 38 skuas en Bahía Esperanza, Península Antártica. No se determinó la causa (Montalti et al., 1996).
- 1997. Mortalidad de 23 skuas en Bahía Esperanza, Península Antártica. No se determinó la causa (Leotta et al., 2002).
- 2000. Muerte de un petrel gigante del sur en Península Potter, Isla 25 de Mayo, Islas Shetland del Sur, debido a Cólera Aviar (Leotta et al., 2003).
- 2000. Mortalidad de skuas y gaviotas cocineras en Bahía Esperanza, Península Antártica, causada por Cólera Aviar (Leotta et al., 2000).

## **1.2. COLERA AVIAR**

Durante la mitad del siglo XVIII, en Europa se observaron varias epornitias. La causa de estas mortalidades masivas de aves fue estudiada en Francia en 1782 por Chabert y en 1836 por Maillet, quién empleó por primera vez el término Cólera Aviar. En 1851, Benjamir realizó una detallada descripción de la enfermedad y demostró que se podía diseminar por cohabitación. En 1880 Louis Pasteur aisló el agente etiológico, lo hizo crecer en caldo de pollo y lo utilizó para producir inmunidad en animales. En el año 1900, Lignieres denominó a la enfermedad “Pasteurelosis Aviar” (Rhoades y Rimler, 1995).

Cólera Aviar es una enfermedad infectocontagiosa de amplia difusión mundial que afecta tanto a las aves domésticas como a las silvestres. Generalmente se presenta como una enfermedad septicémica de curso agudo, con alta morbilidad y alta mortalidad; aunque según la susceptibilidad de la especie aviar afectada, el curso de esta enfermedad puede ser crónico.

### **1.2.1. AGENTE ETIOLOGICO**

El agente etiológico del Cólera Aviar es *Pasteurella multocida* (*Micrococcus gallicidus*, 1883; *Micrococcus cholerae gallinarum*, 1885; *Octopsis cholerae gallinarum*, 1885; *Bacterium cholerae gallinarum*, 1886; *Bacillus cholerae gallinarum*, 1886; *Pasteurella cholerae gallinarum*, 1887; *Coccobacillus avicidus*, 1888; *Pasteurella avicida*, 1889; *Bacterium multacidum*, 1889; *Pasteurella avium*, 1903; *Bacillus avisepticus*, 1903; *Bacterium avisepticum*, 1903; *Bacterium avisepticus*, 1912; *Pasteurella aviseptica*, 1920; *Pasteurella septica*, 1929; *Pasteurella multocida*, 1939) (Rhoades y Rimler, 1995).

#### **1.2.1.1. Taxonomía del Género *Pasteurella***

La descripción original del Género *Pasteurella* fue realizada por Rivolta en 1877 y por Revolee en 1879. Luego de varias décadas en las que se realizaron numerosos cambios en la nomenclatura, Rosenbusch y Merchant designaron como *Pasteurella multocida* al agente etiológico del Cólera Aviar (Muhairwa, 2000). Posteriormente, y en base a la diferenciación fenotípica, se incluyeron más de 20 especies en el Género *Pasteurella* (Koneman et al., 1999). Mutters et al. (1985) utilizaron la hibridación del ADN para establecer la relación genética entre las especies del Género *Pasteurella*, y propusieron la inclusión de las siguientes especies: *P. canis*, *P. stomatis*, *P. dagmatis*, *P. anatis*, *P. langaa*, *P. gallinarum*, *P. volantium*, *P. avium*, *Pasteurella* sp. A, y *Pasteurella* sp. B. Además, *P. multocida*, la especie más común del Género, fue dividida en 3 subespecies: *P. multocida multocida*, *P. multocida gallicida* y *P. multocida*

*septica*, las que se distinguen fenotípicamente por su diferente acción sobre el dulcitol, el sorbitol, la arabinosa y la trehalosa (Tabla 1).

Posteriormente se realizó una nueva reclasificación del Género, y se incluyeron 6 especies más: *P. granulomatis*, *P. caballi*, *P. bettyae*, *P. lymphangitis*, *P. mairii* y *P. trehalosi*. Capitini et al. (2002) basándose en las características bioquímicas y en la secuenciación de 1.536 bases del gen para la molécula 16S del ARNr, propuso una cuarta subespecie: *P. multocida tigris*.

A pesar del notable progreso en la reorganización del Género *Pasteurella*, los resultados obtenidos por hibridación de ARNr:ADN y por secuenciación del gen para la molécula 16S de ARNr, indican que este es muy heterogéneo y que actualmente no se puede determinar una clasificación taxonómica segura. En el anexo I se presenta la clasificación taxonómica actual de la Familia *Pasteurellaceae* según el Subcomité de Taxonomía para *Pasteurellaceae* del Comité Internacional de Sistemática de Procariotes ([www.the-icsp.org/subcombs/Pasteurellaceae.htm](http://www.the-icsp.org/subcombs/Pasteurellaceae.htm)).

#### **1.2.1.2. Ecología del Género *Pasteurella***

Las especies del Género *Pasteurella* demostraron una considerable diversidad ecológica en las membranas mucosas de los animales. Ellas pueden ser comensales e invasoras secundarias de la mucosa de la cavidad oral, del tracto respiratorio alto y del tracto genital inferior de varias especies de vertebrados. Con la excepción de *P. multocida*, el resto de los miembros del Género son considerados patógenos oportunistas que causan infecciones secundarias en animales y en el hombre (Koneman et al., 1999). En las aves, Cólera Aviar es la principal enfermedad causada por *P. multocida* (Rhoades y Rimler, 1989).

#### **1.2.2. PATOGENIA DE COLERA AVIAR**

La patogenia de Cólera Aviar no se determinó con claridad. Sin embargo, se demostró que la severidad de las lesiones puede variar según el hospedador y según los factores de virulencia del agente etiológico (Muhairwa, 2000).

En las aves, se considera que la puerta de entrada de *P. multocida* es a través de las mucosas bucofaríngea, nasal y conjuntival, como así también a través de heridas cutáneas (Rhoades y Rimler, 1995). Muhairwa (2000), demostró que determinadas cepas virulentas de *P. multocida* pueden persistir más tiempo en la mucosa traqueal que otras cepas avirulentas, y sugirió que este hecho podría estar asociado a la expresión de factores de adherencia por parte de las cepas virulentas.

Matsumoto et al. (1991) demostraron que en pollos la septicemia por *P. multocida* fue precedida por diseminación y multiplicación de la bacteria en los pulmones. Aunque algunas cepas virulentas se multiplicaron principalmente en los vasos sanguíneos (Snipes et al., 1987). También se demostró que después de la septicemia los sitios más favorables para la multiplicación de *P. multocida* fueron el bazo y el hígado (Pabs-Garnon y Soltys, 1971). Luego de la colonización y la multiplicación se supone que la muerte de las aves es ocasionada por un shock endotóxico (Rhoades y Rimler, 1987).

Por lo tanto, la puerta de entrada de *P. multocida* en las aves es a través de las mucosas, al comienzo de la infección las cepas virulentas colonizan el tracto respiratorio alto, luego invaden los tejidos y posteriormente llegan a la circulación sanguínea, donde se produce la fase terminal de la infección caracterizada por septicemia, multiplicación en órganos parenquimatosos y shock endotóxico.

### **1.2.3. RESPUESTA INMUNE**



Los microorganismos gram negativos, como *P. multocida*, tienen la capacidad de multiplicarse fuera de las células huésped y lo hacen por ejemplo en la circulación, en el tejido conectivo y en los espacios intercelulares del tracto respiratorio y digestivo.

Los principales mecanismos de la inmunidad innata frente a las bacterias gram negativas son la activación del complemento, la fagocitosis y la respuesta inflamatoria. Estas bacterias se caracterizan por producir endotoxinas y en menor medida exotoxinas. Las endotoxinas, también denominadas lipopolisacáridos (LPS), son componentes de la pared celular bacteriana y actúan como activadores de los macrófagos.

Los macrófagos se unen a las bacterias extracelulares mediante distintos receptores de superficie y a las bacterias opsonizadas mediante los receptores del complemento. Estos receptores estimulan la fagocitosis de las bacterias y la actividad antimicrobiana de los fagocitos.

Los macrófagos activados secretan citocinas como parte de la inmunidad innata. La principal citocina es el factor de necrosis tumoral (TNF), que estimula la atracción de los polimorfonucleares y de los monocitos hacia las zonas de infección. Además, el TNF actúa sobre las células endoteliales vasculares aumentando la permeabilidad vascular y favoreciendo la penetración de los leucocitos en los focos infecciosos. Las citocinas también desencadenan las manifestaciones sistémicas de la infección como fiebre y síntesis de proteínas de fase aguda.

La inmunidad humoral es la respuesta inmunitaria protectora más importante frente a las bacterias extracelulares. Su función consiste en eliminar a los microorganismos y neutralizar sus toxinas. La respuesta de los anticuerpos frente a las bacterias extracelulares está dirigida contra los antígenos de la pared celular y contra las toxinas secretadas.

Una de las funciones de la inmunidad humoral es la defensa frente a las bacterias encapsuladas ricas en polisacáridos. Los mecanismos efectores utilizados por los anticuerpos para

combatir estas infecciones consisten en neutralización, opsonización, fagocitosis y activación del complemento por la vía clásica.

Las consecuencias lesivas más importantes de las respuestas del huésped frente a las bacterias extracelulares son la inflamación y el shock endotóxico. En las infecciones causadas por bacterias gram negativas, la consecuencia patológica más grave inducida por citocinas es el shock endotóxico, un síndrome caracterizado por colapso circulatorio y coagulación intravascular diseminada, cuyo mediador más importante es el TNF. (Abbas et al., 2004).

#### **1.2.4. FACTORES DE VIRULENCIA DE *Pasteurella multocida***

Se considera que todas las cepas de *P. multocida* son potencialmente patógenas, y que bajo ciertas circunstancias son capaces de producir enfermedad en las aves. Algunas cepas son más virulentas que otras, debido a la expresión de varios factores de virulencia. Entre los factores de virulencia se incluyen a) la cápsula, b) las proteínas de membrana externa, c) las toxinas, y d) los determinantes moleculares.

- **Cápsula**

Las bacterias con cápsula rica en polisacáridos resisten la fagocitosis, y por lo tanto serían más virulentas que las cepas homólogas acapsuladas.

Las cepas de *P. multocida* se clasifican en 5 grupos según el tipo capsular: A, B, D, E, y F (Brogden y Packer, 1979; Rimler y Rhoades, 1987). La evidencia acumulada en los últimos años permite considerar que la cápsula es el principal factor de virulencia de *P. multocida*, aunque no el único, ya que algunas cepas acapsuladas fueron muy virulentas (Matsumoto y Strains, 1993). Si bien las cepas del tipo capsular A son la causa más frecuente de Cólera Aviar, también se aislaron cepas de *P. multocida* de los tipos B, D y F a partir de aves enfermas (Rhoades y Rimler, 1995).

Los tipos capsulares no-A, presentan diferentes grados de virulencia. Se comprobó que los tipos B y D solo fueron virulentos en forma experimental y por inyección intramuscular en pavos (Rhoades y Rimler, 1987). El tipo capsular F presentó una virulencia variable en pavos y baja en pollos (Aye et al., 1999). El tipo capsular E se aisló en casos de Septicemia Hemorrágica en bovinos y búfalos de Africa (Carter y de Alwis, 1989) y hasta el presente no se conocen hospedadores aviares.

La cápsula de muchas bacterias gram negativas contienen ácido sialico que inhibe la activación del complemento por la vía alterna. Por lo tanto, la resistencia de algunas cepas a la acción del complemento es uno de los mecanismos de evasión de la respuesta inmune propuesto para *P. multocida* (Snipes y Hirsh 1986).

- **Proteínas de membrana externa**

Las proteínas de membrana externa (OMP) de *P. multocida* fueron estudiadas en forma exhaustiva debido a sus propiedades inmunogénicas (Ruffolo y Adler, 1996). Sin embargo, algunas de estas proteínas fueron consideradas como posibles factores de virulencia (Muhairwa, 2000).

La mayoría de las cepas de *P. multocida* presentan un sistema de recuperación de hierro, mediante el cual son capaces de captar este elemento en condiciones de restricción (Weinberg, 1978; Lee et al., 1991). El sistema de recuperación de hierro es uno de los factores de virulencia asociado a las OMP (Glisson et al., 1991; Zhao et al., 1995).

Otro factor de virulencia atribuido a estas proteínas es la adherencia. Lubke et al. (1994) lograron inhibir la adherencia de *P. multocida* a la mucosa respiratoria, al enfrentar una proteína de 35 kD con anticuerpos específicos. Además, Truscott y Hirsh (1988) concluyeron que el efecto antifagocítico de las OMP podría jugar un importante rol en la patogenia de Cólera Aviar.

- **Toxinas**

Rhoades (1964) observó que las lesiones macroscópicas halladas en pollos enfermos por Cólera Aviar podrían ser debido a endotoxinas. Lee et al. (1991), inocularon pavos con 2 cepas de *P. multocida* de idéntico tipo capsular, una cepa vacunal sensible al complemento, y otra cepa de campo resistente al mismo. Comprobó que ambas cepas liberaron la misma cantidad de endotoxinas cuando se enfrentaron a las proteínas del complemento sérico. Sin embargo, la cepa vacunal perdió viabilidad y la cepa de campo no. Estos hallazgos permitieron demostrar que la cepa de campo fue capaz de crecer en presencia del complemento y al mismo tiempo liberar endotoxinas.

El rol de las endotoxinas en la patogenia de Cólera Aviar fue comprobado por Fichen y Barnes (1989), cuando luego de inocular endotoxinas en los sacos aéreos de un lote de pavos, observaron las mismas lesiones que las provocadas por *P. multocida*: hiperemia, edema y adherencia difusa en los sacos aéreos con fluidos proteináceos y presencia de heterófilos.

En *P. multocida* la exotoxina más estudiada es una dermonecrotóxina que causa la Rinitis Atrófica del Cerdo. Nielsen et al. (1986) investigaron la existencia de una exotoxina en *P. m. multocida*, *P. m. septica*, *P. m. gallicida* y *P. canis*, utilizando células de pulmón de embrión bovino. Al finalizar su trabajo demostraron que solo las cepas de *P. m. multocida* fueron capaces de expresar toxinas citopáticas.

- **Determinantes moleculares**

Las bases genéticas del Cólera Aviar y otras infecciones causadas por *P. multocida* en aves, no se conocen demasiado. La mayoría de la información disponible al respecto no se refiere a los genes asociados con la virulencia de *P. multocida*. Una excepción es la descripción del gen *toxA*,

responsable de la codificación de la dermonecrotina de *P. multocida* y cuyo producto de expresión actúa además como promotor y represor proteico (Foged, 1992). Sin embargo, no se demostró la relación de este gen con la patogenia de Cólera Aviar (Nielsen et al., 1986).

Otros genes de *P. multocida* que pueden ser identificados son: el gen de la adenilato ciclasa, secuencias del gen 16S ARNr, y el gen *oma87*. Sin embargo, aún no se conoce si son genes de virulencia (Mock et al., 1991; Ruffolo y Adler, 1996).

Las cepas de *P. multocida* pueden portar plásmidos (Snipes et al., 1990; Price et al., 1993; Diallo et al., 1995) y a través de ellos pueden adquirir resistencia a los antibióticos (Hirsh et al., 1985; 1989), aunque esto no significa que los plásmidos contribuyan en la virulencia de las cepas. Además, Price et al. (1993) demostraron que las cepas carentes de plásmido fueron más virulentas que las cepas portadoras. Por lo tanto, aún no es posible relacionar la portación de plásmido con la virulencia de *P. multocida*.

### **1.2.5. DIAGNOSTICO DE COLERA AVIAR**

El diagnóstico definitivo de Cólera Aviar debe sustentarse en los datos de campo, en los signos clínicos de las aves, en los hallazgos de necropsia y en el aislamiento de *P. multocida* (Rhoades y Rimler, 1995).

- **Signos y lesiones**

Según las manifestaciones clínicas y los hallazgos patológicos se pueden observar 3 presentaciones de Cólera Aviar: a) aguda, b) subaguda, y c) crónica.

En las aves silvestres no es frecuente observar signos clínicos de Cólera Aviar, debido a la rapidez con que ocurren las muertes al comenzar la enfermedad (Rosen y Bischoff, 1949; Rosen, 1969). En el estado de agonía se puede observar: tortícolis, convulsiones y varios ml de una espesa descarga nasal, en la cual se encuentra una abundante cantidad de *P. multocida* (Botzler,

1991). Las aves mueren rápidamente, y por ende presentan una buena condición física. En las aves domésticas los signos que se presentan son fiebre, anorexia, plumas erizadas, excreciones mucosas de la cavidad buco-faríngea, diarrea y aumento de la frecuencia respiratoria. La materia fecal es acuosa y de color blanco, para luego presentar color verdoso y consistencia mucosa.

En la mayoría de las aves silvestres en las que se diagnosticó Cólera Aviar, se observó la presentación aguda de la enfermedad y las lesiones descritas con mayor frecuencia fueron: poliserositis, adherencia de las membranas serosas a los órganos de la cavidad celómica, hemorragias subserosas e infiltración celular. Hemorragias generalizadas, degeneración y mineralización de las miofibrillas del músculo esquelético. En el hígado se observó necrosis focal aguda y múltiples áreas de necrosis coagulativa localizadas con una evidente infiltración heterofílica. En algunas ocasiones fue posible observar enteritis mucoide con abundante cantidad de *P. multocida* (Rhoades y Rimler, 1995).

Las lesiones observadas comúnmente en el sistema respiratorio fueron aerosaculítis, neumonía, hemorragia, edema, congestión e infiltración heterofílica en los pulmones. Presencia de heterófilos, linfocitos y colonias bacterianas en el mesobronquio, en los bronquios secundarios y en los parabronquios.

En el sistema cardiovascular se describieron hemorragias petequiales y equimóticas en el miocardio y en la grasa del corazón, pericarditis fibrinosa y aumento del líquido pericárdico con color amarillo opaco. Acumulación de bacterias y células de la inflamación en el pericardio. Respecto al sistema linfoide, se observó congestión y focos de necrosis aguda en el bazo. Entre las aves domésticas, las lesiones en el tracto respiratorio se observan con mayor frecuencia en los pavos, y las lesiones del tracto digestivo en las gallinas (Rhoades y Rimler 1995).

Las presentaciones subaguda y crónica de la enfermedad no fueron descritas con frecuencia en las aves silvestres, aunque entre los casos citados se incluyen aves de presa y aves carroñeras (Zinkl et al., 1977; Morishita et al., 1997; Leotta et al., 2003).

Las lesiones descritas en el cuadro subagudo fueron hiperemia y hemorragias generalizadas. Acumulo de fibrina en las membranas serosas de la cavidad celómica, principalmente en el pericardio. Infiltración de heterófilos, macrófagos, y linfocitos. Edema, congestión y hemorragia perivascular en los pulmones, hepatomegalia y esplenomegalia (Leotta et al., 2003).

En el curso crónico de Cólera Aviar los signos se vinculan con infecciones y edemas localizados; como por ejemplo en las articulaciones, en el seno infraorbitario y en la bolsa esternal. Además, pueden observarse lesiones exudativas en las conjuntivas y en la cavidad buco-faríngea (Rhoades y Rimler, 1995). Las lesiones descritas en el cuadro crónico de Cólera Aviar fueron edema facial y conjuntivitis. Las lesiones crónicas localizadas fueron descritas en el oído medio, en los huesos del cráneo y en las articulaciones plantares. En aves de presa se describieron lesiones en la cavidad buco-faríngea y en el esófago (Morishita et al., 1997). También se describieron lesiones en el sistema respiratorio, como por ejemplo, neumonía y acumulo de exudado caseoso de color amarillo en el espacio aéreo de los huesos neumáticos. Las lesiones histopatológicas se caracterizaron por la presencia de células gigantes, macrófagos y heterófilos, como así también por la mineralización de las lesiones del tracto respiratorio (Rhoades y Rimler, 1995; Morishita et al., 1997).

De acuerdo con las lesiones descritas, el diagnóstico diferencial de Cólera Aviar debe realizarse con *Chlamydophila psittaci* (Clamidirosis), *Escherichia coli* (Colibacilosis), *Mycoplasma gallisepticum* (Mycoplasmosis), *Avibacterium paragallinarum* (Coriza Infecciosa),

*Aspergillus* spp. (Aspergilosis), *Salmonella* spp. (Salmonelosis), Enfermedad de Newcastle, Bronquitis Infecciosa, Influenza y Laringotraqueítis (Rhoades y Rimler, 1995).

- **Diagnóstico bacteriológico**

*Pasteurella multocida* desarrolla bien en agar chocolate y agar sangre de carnero, aunque se describieron varios medios selectivos para su aislamiento (Moore et al., 1994). En agar sangre esta bacteria presenta colonias lisas, de color gris y con un diámetro de 0,5 a 2 mm después de 24 h de incubación con 10% de CO<sub>2</sub>. No produce hemólisis y no desarrolla en medios entéricos selectivos. La temperatura óptima para el crecimiento es de 37°C y el pH óptimo varía entre 6,2 y 9,0. A menudo los cultivos emanan un olor característico debido a la gran producción de indol (Koneman et al., 1999).

*Pasteurella multocida* es una bacteria gram negativa, capsulada que mide 0,2 a 0,4 μ de ancho por 0,6 a 2,5 μ de largo. Su forma puede ser cocobacilar o bacilar, con una evidente coloración bipolar al ser teñida con azul de metileno, coloración de Wright, Giemsa o Gram (Koneman et al., 1999). Sin embargo, luego de varios repiques tiende a ser pleomórfica y puede agruparse en cadenas cortas o presentar aspecto filamentoso.

Luego de realizar un aislamiento presuntivo de *P. multocida*, se debe realizar la identificación bioquímica. Todos los miembros del Género *Pasteurella* son microorganismos gram negativos, aerobios-anaerobios facultativos, no esporulados e inmóviles. La mayoría de las especies son catalasa positiva, reducen el nitrato a nitrito, y producen ácido a partir de glucosa, manosa y sacarosa (Koneman et al., 1999).

Actualmente, existe una alternativa a los métodos tradicionales para la identificación de bacterias y es la utilización de técnicas basadas en la tecnología del ADN. Respecto a la identificación de *P. multocida* a partir de métodos genotípicos, solo se describieron 2 técnicas de



reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que proponen potenciales ventajas en el diagnóstico de laboratorio. Una de ellas se basa en la amplificación de un segmento del gen que codifica para la proteína de membrana externa P6-like (PSL) (Kasten et al., 1997) y la otra se basa en la amplificación de una secuencia de ADN denominada KMT1, la cual fue hallada en forma fortuita por Townsend et al. (1998).

#### **1.2.6. SUBTIPIFICACION DE *Pasteurella multocida***

La premisa básica inherente a todos los sistemas de tipificación es que los aislamientos epidemiológicamente relacionados derivan de la expansión clonal de un único precursor. Consecuentemente, comparten características comunes que difieren de aquellos aislamientos epidemiológicamente no relacionados. Las especies de *P. multocida* presentan linajes genéticos divergentes, y esta divergencia evolutiva refleja la acumulación de mutaciones no letales al azar, como sustitución de un par de bases, delección de un gen individual o la adquisición de ADN de otras especies microbianas. Con el desarrollo de técnicas moleculares altamente sensibles, es posible detectar alteraciones genéticas mínimas con precisión, como así también los complejos mecanismos que originan tales variaciones genéticas. Sin embargo, es importante considerar que hasta el presente no existe una “técnica de oro” para la subtipificación de *P. multocida*.

Las técnicas de subtipificación sirven de complemento a las investigaciones epidemiológicas. Estas técnicas tienen una amplia aplicación en microbiología veterinaria ya que permiten: a) establecer si un animal infectado es parte o no de un brote; b) detectar la vía de transmisión de patógenos; c) identificar la fuente de infección en brotes y casos esporádicos; d) determinar si las cepas aisladas pertenecen a clones previamente reconocidos como virulentos; y e) controlar programas de inmunización.

## **A.- Técnicas de subtipificación fenotípica**

Inicialmente la subtipificación se realizaba mediante la caracterización de uno o varios marcadores fenotípicos. La limitación de estas técnicas es que los microorganismos pueden alterar la expresión de los genes que codifican. Tales cambios pueden ocurrir en forma no predecible, o bien, en respuesta a estímulos del medio ambiente. Además, mutaciones puntuales representando un simple nucleótido en todo el cromosoma, pueden modificar la regulación o la función de los genes responsables para un fenotipo particular. Así, aislamientos que representan la misma cepa y que son genéticamente indistinguibles entre si pueden variar en el fenotipo detectado. Entre las técnicas clásicas se encuentran: biotipificación, serotipificación, sensibilidad a los antimicrobianos, fagotipificación y técnicas basadas en la separación de proteínas.

### ***a) Biotipificación***

Se refiere al establecimiento del patrón de actividad de hasta 20 enzimas metabólicas. Aunque las cepas relacionadas epidemiológicamente pueden exhibir biotipos únicos, en general el poder discriminatorio de esta técnica es pobre. La técnica tiene sensibilidad limitada para distinguir cepas distintas dentro de una especie dada, ya que variaciones en la expresión genética hacen que los aislamientos de una misma cepa difieran en una o más reacciones bioquímicas. La biotipificación no se utilizó en forma extensiva para la realización de estudios epizootiológicos de *P. multocida* (Fegan et al., 1995).

### ***b) Serotipificación***

La serotipificación fue la primer técnica de tipificación fenotípica desarrollada para el análisis de *P. multocida*. Las técnicas de tipificación serológica utilizadas con mayor frecuencia son la tipificación capsular y la serotipificación somática. Mediante la técnica de inhibición de la hemoaglutinación se distinguieron 5 tipos capsulares A, B, D, E y F (Brogden y Packer, 1979).

Sin embargo, en la actualidad es posible determinar el tipo capsular por PCR (Townsend et al., 2001) mediante la detección de genes específicos que codifican para proteínas que intervienen en la síntesis capsular.

La serotipificación somática incluye 2 técnicas, la aglutinación en tubo (Namioka y Murata, 1961) y la difusión y precipitación en gel (Heddleston et al., 1972, Brogden y Packer, 1979). Se reconocen 11 serotipos por el sistema de Namioka (1-11) y 16 serotipos por el sistema de Heddleston (1-16).

La mayoría de los serotipos somáticos descritos en el esquema propuesto por Heddleston et al. (1972) fueron posteriormente aislados de aves silvestres y domésticas, con y sin sintomatología de Cólera Aviar (Rhoades y Rimler, 1987; Blackall et al., 1998). Los tipos capsulares pueden presentarse en combinación con una variedad de serotipos somáticos, aunque se demostró que la mayoría de los serotipos somáticos relacionados con enfermedad presentan tipo capsular A (Rhoades y Rimler, 1995). Los serotipos somáticos 1, 3 y 4, de tipo capsular A, son considerados la causa más frecuente de Cólera Aviar (Bhasin, 1982; Hirsh et al., 1990). La información disponible acerca de la virulencia de los serotipos somáticos es escasa y aún no fue posible determinar con seguridad el rol los 16 serotipos somáticos en la patogenia del Cólera Aviar.

### ***c) Sensibilidad a los antimicrobianos***

Se realiza rutinariamente por los laboratorios de microbiología clínica para la evaluación de la mayoría de los aislamientos bacterianos. Ambos sistemas, manual y automatizado, están ampliamente difundidos, son fáciles de usar y relativamente poco costosos. Si bien, con la identificación de un nuevo patrón de resistencia antibiótica entre aislamientos provenientes de diferentes animales se puede sospechar la existencia de un brote, la sensibilidad antibiótica tiene

utilidad relativamente limitada en estudios epidemiológicos. Esto es debido a variaciones fenotípicas y a que la resistencia puede ser afectada por la presión de selección. Hay múltiples mecanismos genéticos por los cuales la resistencia antimicrobiana puede evolucionar rápidamente en una cepa o ser adquirida de otras (Mayer, 1988). Es de particular interés considerar que los plásmidos y otros elementos genéticos móviles portan genes de resistencia y pueden ser intercambiados entre las cepas. Consecuentemente, cepas diferentes pueden desarrollar un patrón de resistencia similar y aislamientos de la misma cepa pueden exhibir diferentes patrones de sensibilidad antibiótica. En general, *Pasteurella multocida* es sensible a los siguientes antimicrobianos: ampicilina, cefalosporinas de segunda generación, cefalosporinas de tercera generación, cloranfenicol, penicilinas de espectro ampliado y tetraciclina. Las cefalosporinas de primera generación, la eritromicina, los aminoglucósidos y las penicilinas semisintéticas poseen una menor actividad contra *P. multocida*, aunque esta bacteria es resistente a vancomicina y clindamicina (Koneman et al., 1999).

#### ***d) Tipificación por bacteriófagos (fagotipificación)***

Esta técnica es aplicable en aquellas especies bacterianas para las cuales se identificó un número de bacteriófagos líticos (virus capaces de infectar y lisar la célula bacteriana). En esta técnica, los aislamientos se caracterizan por su susceptibilidad o resistencia a la lisis de cada miembro de un panel de bacteriófagos. Esta técnica presenta varias limitaciones y debido a la necesidad de mantener un stock de fagos biológicamente activos y cepas de control, la fagotipificación sólo es factible de realizar en laboratorios de referencia.

#### ***e) Perfil proteico***

Las técnicas basadas en la separación proteica que se aplican a *P. multocida* incluyen: perfil de OMP (Knights et al., 1990), perfil de proteínas celulares totales (WCP) y multilocus enzimático (MLEE) (Blackall et al., 1998).

En la mayoría de los trabajos se utilizó **OMP** para obtener vacunas debido al poder inmunogénico que poseen estas proteínas (Ikeda y Hirsh, 1988, Choi-Kim et al., 1991), aunque en algunas investigaciones se utilizó esta técnica para tipificar cepas (Dabo et al., 1999).

El **WCP** se utilizó en el análisis de cepas de *P. multocida* tipos D y E, aisladas de brotes de Septicemia Hemorrágica Bovina, pero no se evaluaron los beneficios potenciales de esta técnica en estudios epidemiológicos.

El **MLEE** detecta diferencias en la movilidad electroforética de enzimas metabólicas solubles. Las proteínas celulares de los microorganismos son separadas por electroforesis en gel de almidón y las enzimas son identificadas con el uso de sustratos específicos. Las variaciones en la movilidad electroforética generalmente reflejan sustituciones de aminoácidos que alteran la carga de la proteína y por lo tanto identifican variaciones en los genes cromosómicos que codifican la enzima. El MLEE fue considerado de gran valor para establecer la diversidad poblacional de *P. multocida* (Blackall et al., 1998) y para determinar la relación entre diferentes brotes de Cólera Aviar (Blackall et al., 1999). Si bien los resultados obtenidos al analizar cepas de *P. multocida* con MLEE se asemejan a los alcanzados con algunas técnicas genotípicas (REA, ribotipificación), algunos autores sugieren que la expresión de las propiedades fenotípicas, como las medidas por MLEE, no son tan estables como el ADN (Muhairwa, 2000).

### **B.- Técnicas de subtipificación genotípica**

Las técnicas de subtipificación molecular revolucionaron la epidemiología. El avance en las técnicas de purificación, separación y amplificación de los ácidos nucleicos desde 1975 y las

limitaciones que presentan la mayoría de las técnicas fenotípicas (problemas de tipificación, baja reproducibilidad y bajo poder discriminatorio) estimularon el desarrollo y mejoramiento de las técnicas de tipificación basadas en el estudio del ADN. Entre las técnicas más utilizadas se encuentra el análisis de los perfiles genéticos obtenidos mediante el corte de ADN plasmídico y cromosómico utilizando enzimas de restricción; las técnicas basadas en PCR; y las técnicas combinadas. Sin embargo, el análisis del ADN cromosómico es el más apropiado para complementar estudios epidemiológicos de *P. multocida* (Snipes et al., 1990; Blackall y Miflin, 2000).

Varios esquemas de tipificación molecular se aplicaron en diferentes estudios de *P. multocida*, como por ejemplo la identificación del origen de la infección en aves de corral (Snipes et al., 1990; Christensen et al., 1998), la correlación de un brote con cepas vacunales (Kim y Nagaraja, 1990), y el análisis de varios brotes de Cólera Aviar en aves silvestres en Dinamarca (Pedersen et al., 2003). Entre las técnicas utilizadas para la subtipificación molecular de *P. multocida* se encuentran: a) análisis del ADN plasmídico, b) análisis con endonucleasas de restricción (REA) (Blackall y Miflin, 2000) (Diallo et al., 1995; Wilson et al., 1993; 1995), c) ribotipificación (Carpenter et al., 1991; Petersen et al., 2001) (Blackall et al., 1995; Snipes et al., 1990), d) técnicas basadas en PCR (Amonsin et al., 2002; Gunawardana et al., 2000), e) electroforesis en campo pulsado (PFGE) (Kodjo et al., 1999; Pedersen et al., 2003), f) amplificación de fragmentos polimórficos largos (AFLP) (Amonsin et al., 2002), y g) tipificación de secuencias multilocus (MLST) (Spratt, 1999).

#### ***a) Análisis de ADN plasmídico***

Básicamente, los plásmidos son purificados y separados por electroforesis en gel de agarosa para determinar su número y tamaño. Puede obtenerse información adicional mediante la digestión del

plásmido con endonucleasas de restricción, para luego comparar el patrón de restricción resultante. Técnicamente, el análisis de plásmidos es la más simple de las técnicas basadas en el uso de ADN y puede ser realizada eficientemente con equipamiento electroforético básico y reactivos comerciales. Sin embargo, este análisis solo puede utilizarse en cepas que portan plásmidos de diferente peso molecular. Además, los plásmidos son moléculas de ADN extracromosomales que pueden presentar el mismo origen de replicación, y ser miembros de la misma línea clonal, lo que podría dificultar su diferenciación. Sin embargo, Ikeda y Hirsh (1990) observaron que la portación de plásmidos en *P. multocida* no implica clonalidad.

La mayoría de los autores coincide en que el perfil plasmídico es una técnica fácil de realizar y de bajo costo, aunque tiene limitadas aplicaciones en investigaciones epidemiológicas, ya que no todas las cepas de *P. multocida* son portadoras de plásmidos o los pueden perder a través de sucesivos repiques (Amonsin et al., 2002).

#### ***b) Análisis con endonucleasas de restricción***

A través del análisis de los sitios de restricción es posible determinar variaciones en la secuencia de ADN. Este método consiste en la comparación del número y el tamaño de los fragmentos producidos por la digestión del ADN cromosómico con REA. Estas enzimas clivan el ADN en una posición constante dentro de un sitio de reconocimiento específico compuesto por 4 a 6 pares de bases. Debido a la alta especificidad de las enzimas de restricción, la digestión completa de un ADN determinado con una enzima específica provee perfiles de fragmentos reproducibles. Estos fragmentos usualmente presentan un tamaño entre 100 y 20.000 pb que pueden ser separados por electroforesis en gel de agarosa y visualizados por tinción con bromuro de etidio.

Las variaciones de los perfiles de los fragmentos generados por una enzima de restricción específica se denominan RFLP. El RFLP puede resultar de modificaciones en la secuencia debido

a inserciones o deleciones del ADN, o sustitución de bases dentro del sitio de clivaje. La selección de la enzima a utilizar se realiza en forma empírica y se basa en 2 criterios importantes: a) el tamaño de los fragmentos de restricción deben ser adecuados para que el patrón obtenido sea comparable, y b) los fragmentos en este rango de tamaño no deben ser demasiado numerosos, para evitar la superposición de bandas que podrían ocultar las diferencias entre los patrones.

Durante la última década se utilizó REA y ribotipificación para complementar estudios epidemiológicos de *P. multocida*. Con estas técnicas se obtuvieron mejores resultados que con las técnicas fenotípicas tradicionales (Kim y Nagaraja, 1990; Wilson et al., 1992; 1993; Blackall et al., 1995; 2000).

### ***c) Ribotipificación***

En la ribotipificación, un gran número de fragmentos de ADN obtenidos por REA son transferidos a una membrana e hibridizados con una sonda de ADN correspondiente a la molécula 16S de ARNr o 23S de ARNr (Grimont y Grimont, 1986). La secuencia ribosomal es altamente conservada.

Si bien la ribotipificación se utilizó en varios estudios epidemiológicos de *P. multocida* (Snipes et al., 1990; Blackall et al., 1995, Christensen et al., 1998; Muhairwa, 2000), existen numerosas discrepancias sobre su aplicación. Amonsin et al. (2002) consideran que es una técnica limitada, laboriosa y que insume demasiado tiempo. Sin embargo, Blackall y Mifflin (2000) consideran que la ribotipificación posee un buen poder discriminatorio.

### ***d) Técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa***

La característica esencial de PCR es la habilidad para amplificar rápidamente y en forma exponencial una secuencia particular de ADN. La reacción requiere de una ADN polimerasa, una mínima cantidad de ADN y 2 oligonucleótidos utilizados como cebadores o “*primers*”. Bajo



condiciones adecuadas, una cantidad detectable de producto es generado en pocas horas. Originalmente se describió para proveer solo resultados positivos o negativos, por lo cual tuvo que ser mejorada para su utilización en epidemiología molecular.

**RAPD-PCR** se refiere a la utilización de un cebador de secuencia corta, aproximadamente de 10 pb, que reconoce y amplifica secuencias al azar dentro del ADN genómico. El número y lugar de estos sitios de reconocimiento de secuencias dentro del ADN genómico varían para aislamientos diferentes de una especie bacteriana. Los productos de amplificación se separan mediante electroforesis en gel de agarosa, dando un patrón de bandas que, en teoría, es característico de una cepa bacteriana particular. El número y tamaño de los fragmentos es la base para la subtipificación del aislamiento. Esta técnica presenta ciertas limitaciones como la baja reproducibilidad y la falta de estandarización (Blackall y Miflin, 2000).

Se denomina **Rep-PCR** a la amplificación de secuencias de ADN repetitivo dentro del genoma bacteriano. Existen 2 grupos principales de elementos repetitivos que son utilizados para la subtipificación de bacterias, a) los elementos palindrómicos extragénicos repetitivos (REP) que ocupan el 1% del genoma y están representados por 500 a 1.000 secuencias repetidas de ADN con un tamaño de 33 a 44 pb (Stern et al., 1984), y b) las secuencias repetitivas intergénicas de consenso de las enterobacterias (ERIC) que son otras secuencias utilizadas con éxito para la subtipificación de enterobacterias. Las secuencias ERIC son elementos de 126 bp los cuales contienen una secuencia central altamente conservada que está localizada en regiones extragénicas del genoma bacteriano. Inicialmente fueron definidas sobre las secuencias obtenidas de *E. coli* y *S. Typhimurium* (Versalovic et al., 1991).

Como resultado de las Rep-PCR se observan múltiples bandas, que dependen de la distribución y la localización de las secuencias repetidas a lo largo del genoma. Algunas técnicas

basadas en PCR, como por ejemplo RAPD y REP-PCR presentan buen poder discriminatorio para el análisis de *P. multocida*, pero son poco reproducibles entre laboratorios, en especial RAPD (Blackall y Miflin, 2000). Sin embargo, Amonsin et al. (2002) obtuvieron buenos resultados al utilizar ERIC-PCR.

#### ***e) Electroforesis en campo pulsado***

Esta técnica se basa en la utilización de enzimas de restricción de corte poco frecuente que generan un número relativamente pequeño de fragmentos de ADN de gran tamaño. La separación de estos fragmentos de ADN se logra por la reorientación molecular inducida por cambios periódicos en el campo eléctrico. La duración del campo eléctrico alternado determina el rango de tamaño del ADN que puede ser separado en un gel de agarosa. La técnica de PFGE es aplicada con fines epidemiológicos debido a su sensibilidad (ya que estudia el genoma en su totalidad), reproducibilidad y alto índice discriminatorio cercano al valor ideal de 1 (Maslow et al., 1993). Se considera que PFGE es la técnica de oro para la subtipificación bacteriana. Varios autores obtuvieron excelentes resultados al utilizar PFGE en la investigación epidemiológica de una variedad de microorganismos, incluyendo *E. coli* (Chinen et al., 2002), *S. Gallinarum* (Leotta et al., 2004), *Streptococcus bovis* (Pedersen et al., 2003), *Pseudomona aeruginosa* (Hammer et al., 2003), *Campylobacter jejuni* (Pedersen y Wedderkopp, 2003) y *Clostridium perfringens* (Nauerby et al., 2003). Hasta el presente esta técnica no fue utilizada en forma rutinaria para estudios de epidemiología molecular de Cólera Aviar (Gunawardana et al., 2000; Pedersen et al., 2003).

#### ***f) Polimorfismo de longitud de los fragmentos amplificados***

AFLP es una técnica basada en la amplificación selectiva de un subgrupo de fragmentos de ADN generados por digestión con enzimas de restricción. Originalmente, aplicada a la caracterización

de genomas de plantas y posteriormente a la subtipificación bacteriana. Se describieron 2 técnicas de AFLP, una con 2 enzimas de restricción diferentes y 2 cebadores para la amplificación, y la segunda una enzima de restricción y un cebador. En la forma más común, el ADN bacteriano se extrae, se purifica y se somete a la digestión enzimática. Luego, el fragmento de restricción es ligado a “linkers” que contienen cada sitio de restricción y una secuencia de sitios de unión a los cebadores. Los productos de amplificación son luego visualizados según el sistema de marcación utilizado (marcación radioactiva, fluorescencia, o bromuro de etidio). El poder discriminatorio de esta técnica es mayor que el de la ribotipificación; sin embargo, aún no fue comparada con REP-PCR o con PFGE. AFLP se utilizó para subtipificar cepas de *P. multocida* epidemiológicamente relacionadas (Amonsin et al., 2002; Guimaraes et al., 2004), aunque no se determinó su reproducibilidad entre laboratorios.

#### ***g) Tipificación de secuencias multilocus***

MLST se basa en la secuenciación de segmentos de 500-600 pb de genes implicados en el metabolismo celular. Los datos de secuencia que son analizados determinan la relación genética existente entre las bacterias. Esta técnica fue aplicada con éxito para el estudio de *Salmonella* spp. y *Vibrio cholerae* (Kotetishvili et al., 2002) y su aplicación para el análisis de *P. multocida* está siendo evaluada ([www.mlst.net/misc/new\\_schemes.asp](http://www.mlst.net/misc/new_schemes.asp)).

Tanto MLST como PFGE son técnicas que presentan un gran poder discriminatorio y muy buena reproducibilidad entre laboratorios. Debido a su alto costo, y a que requieren la utilización de equipos especiales y una meticulosa extracción de ADN (Gunawardana et al., 2000; Pedersen et al., 2003) su utilización se limita a laboratorios de referencia (Blackall y Mifflin, 2000).

### **1.2.7. EPIZOOTIOLOGIA DE COLERA AVIAR EN AVES SILVESTRES**

Wobeser considera “enfermedad” a cualquier deterioro o modificación de las funciones normales de un organismo, provocadas por respuestas a factores ambientales, por agentes infecciosos, por defectos hereditarios o combinaciones de estos. La identificación de los factores que intervienen en el desencadenamiento de alguna enfermedad de origen infeccioso se basa en el estudio de la interacción del agente, el hospedador y el medio ambiente; cambios tales como el aumento poblacional del hospedador, la introducción de un nuevo patógeno o un cambio en el medio ambiente pueden ocasionar el brote de una enfermedad. Teniendo en cuenta estos conceptos se debe considerar a la “enfermedad” en términos ecológicos (Wobeser, 1981).

El primer brote de Cólera Aviar descrito en aves silvestres se registró en el Lago Nakuru, Kenya, en febrero de 1940 (Hudson, 1959) y afectó a 40 gansos (*Alopochen aegyptiacus* y *Plectropterus gambensis*). En la misma década se describió un brote de Cólera Aviar en Chile que afectó a patos marinos, pelícanos y gaviotas (Suarez e Ilazabal, 1941).

El Cólera Aviar es una enfermedad que afecta a las poblaciones de aves silvestres y domésticas de todo el mundo. Los primeros estudios sobre el impacto de esta enfermedad en las poblaciones de aves silvestres migratorias se realizaron en Europa y en los Estados Unidos de Norteamérica (EE.UU.) (Botzler, 1991), ya que se reconoció al Cólera Aviar como un grave problema para las aves domésticas de producción masiva y a las aves silvestres como portadoras de *P. multocida* (Oddo et al., 1977; Wilson et al., 1979; Morishita et al., 1996).

En Italia, durante el siglo XVII se describió una enfermedad en las aves silvestres que presentaba características similares a las observadas en Cólera Aviar (Botzler, 1991). En Alemania, en 1888 se reportó esta enfermedad en faisanes salvajes (*Phasianus colchicus*), pero no se aisló el agente etiológico. En Holanda, los primeros registros datan de 1945 e indican que antes de la presentación de un brote de Cólera Aviar en aves domésticas, se observó esta

enfermedad en patos silvestres (*Anas platyrhynchos* y *Anas crecca*) y gaviotas (*Larus* spp.) (Van den Hurk, 1946). La mayoría de los brotes de Cólera Aviar en las aves silvestres de Europa afectaron a palomas (*Streptopelia decaocto*), cuervos (*Corvus* spp) y gorriones (*Passerculus sandwichensis*) (Wetzel y Rieck, 1972).

Las primeras epizootias de Cólera Aviar conocidas en EE.UU. ocurrieron en Texas (Quortrup et al., 1946) y en el Norte de California durante el invierno de 1943-1944 (Rosen y Bischoff, 1941), pero se considera que la enfermedad fue introducida entre 1880 y 1882 (Botzler, 1991).

Posteriormente, el Cólera Aviar fue reportado en gaviotas cocineras (*Larus dominicanus*) de Sudáfrica (Kaschula y Trutter, 1951), en patos silvestres (*Netta peposaca*) de Japón (Fujihara et al., 1986; Nakamine et al., 1992), en gansos de Canadá (*Branta canadensis*) (Windingstad et al., 1983), en gansos de nieve (*Chen caerulescens*) y gansos de ross (*Chen rossi*) que nidifican en el Artico (Samuel et al., 1997), en pingüinos rockhopper de Nueva Zelanda (de Lisle et al., 1990) y en skuas que nidifican en la Antártida (Parmelee et al., 1979).

No existe una clara explicación para determinar porque a partir del siglo XX aumentaron los casos de Cólera Aviar en las aves silvestres del mundo. Botzler (1991) propuso 2 teorías: a) un mayor conocimiento de la enfermedad, y b) una rápida diseminación de *P. multocida*.

Actualmente, se conocen más de 100 especies de aves silvestres que fueron infectadas naturalmente por *P. multocida*. Sin embargo, en los archivos de varias reservas naturales existen reportes no publicados con los que se podría demostrar un mayor rango de hospedadores (Botzler, 1991). Probablemente y bajo determinadas circunstancias, la mayoría de las aves podrían ser susceptibles al Cólera Aviar.

La mortalidad de aves puede deberse a numerosas causas, sin embargo, cuando se presentan brotes de esta enfermedad, el impacto es impredecible. Por ejemplo, en California la mortalidad de aves silvestres oscila en un rango de 10.000 a 25.000 aves por año, pero en el invierno de 1965-1966 se registró una epizootia de Cólera Aviar y las aves muertas superaron las 70.000 (Titcher, 1979).

Si bien se conocen las consecuencias que puede ocasionar un brote de Cólera Aviar en aves silvestres, todavía no se demostró el origen del agente etiológico en áreas enzoóticas. Sin embargo, se propusieron diferentes reservorios de la enfermedad y para demostrarlo se evaluó experimentalmente la supervivencia de la bacteria en el suelo (Olson y Bond, 1968) y en el agua (Bredy y Botzler, 1989). Como resultado de estas investigaciones se concluyó que los cuerpos de agua dulce en sitios enzoóticos pueden ser un reservorio de *P. multocida* (Botzler, 1991).

Durante el siglo pasado varios autores demostraron en forma experimental que las aves domésticas y silvestres podían ser reservorio de Cólera Aviar. Pritchett et al. (1930; 1932) demostraron que un lote de pollos que superó la enfermedad fue reservorio de *P. multocida* y originó nuevos brotes. Además, se aisló *P. multocida* de los pollos portadores luego de un año. Quortrup et al. (1946) desafiaron a un pato silvestre (*Anas platyrhynchos*) con *P. multocida* y demostraron que las aves silvestres pueden actuar como reservorio de Cólera Aviar. El ave resistió la enfermedad, diseminó el agente etiológico y las aves con las que compartía el ambiente enfermaron de Cólera Aviar.

Para comprobar el rol de las aves silvestres como reservorio de *P. multocida*, se realizaron varios estudios sobre poblaciones de aves sin sintomatología clínica de Cólera Aviar. En Missouri (EE.UU.), se aisló *P. multocida* del bazo e hígado de 3 gallaretas americanas (*Fulica americana*) aparentemente sanas (Vaught et al., 1967); sin embargo, en otro estudio realizado en

el mismo sitio, se tomaron muestras de nasofaringe a 400 aves silvestres y no se aisló la bacteria (Donahue y Olson, 1969). Korschgen (1978) analizó muestras buco-faríngeas de 357 hembras de patos (*Somateria mollissima*) sin manifestación de enfermedad y en solo un animal aisló *P. multocida*. Samuel et al. (1997) sobre un total de 298 gansos de nieve adultos aislaron 2 cepas de *P. multocida* y demostraron la patogenicidad de las mismas mediante su inoculación en patos. De esta manera confirmaron que las aves silvestres pueden ser portadoras de *P. multocida*, aunque las cepas aisladas no se relacionaron con ningún brote de la enfermedad en el área. Posteriormente, Samuel et al. (1999) aportaron nueva evidencia que permite sugerir que los gansos de nieve podrían ser reservorio de Cólera Aviar al detectar aves seropositivas.

Otro tema de investigación fue la transmisión de Cólera Aviar en las poblaciones de aves silvestres, debido a que cuando esta enfermedad se manifiesta se puede transmitir a otras poblaciones de aves a través de insectos, por inhalación y por ingestión (Botzler, 1991).

Se demostró que la garrapata blanda (*Argas persicus*) puede transmitir *P. multocida* a las aves domésticas. Se aisló *P. multocida* de ácaros (*Dermanyssus gallinae*) recolectados de patos con Cólera Aviar (Quortrup et al., 1946) y del intestino de moscas (*Eomenacanthus stramineus* y *Menopon gallinae*) que se alimentaron de gallinas muertas por Cólera Aviar (Derylo, 1969; 1970). Si bien se conoce el rol de los insectos en la transmisión de *P. multocida* en aves domésticas, aún no se demostró en las poblaciones de aves silvestres.

Varios autores demostraron que *P. multocida* puede ser transmitida por inhalación de aerosoles bacterianos (Rosen y Morse, 1959; Donahue y Olson, 1971; Simensen et al., 1980). La concentración de *P. multocida* virulenta puede aumentar en los cuerpos de agua dulce durante una epizootia de Cólera Aviar. Se demostró que la mayor concentración bacteriana se encuentra en la superficie del agua, y que al generarse burbujas de aire en la interfase aire-agua, se

remueven las bacterias concentradas en la superficie. La concentración de bacterias en las microgotas producidas al romperse las burbujas fue de 10 a 1.000 veces superior a la concentración bacteriana del agua. Mediante este estudio se comprobó que las salpicaduras pueden crear aerosoles ricos en bacterias (Potter, 1961; 1964). Los resultados obtenidos en esta experiencia pueden explicar algunos episodios de Cólera Aviar, especialmente al complementarse con el comportamiento de las aves, como por ejemplo la forma en que remontan vuelo desde el agua.

Algunas especies de aves, como las gallaretas americanas, se caracterizan por remontar vuelo sobre el agua en forma horizontal y en bandadas numerosas, por lo cual generan una gran cantidad de aerosoles. En California, durante una epizootia de Cólera Aviar, se observó que las gallaretas murieron antes y en mayor proporción que otras especies que levantan vuelo en forma vertical y aislada (Combs, 1988).

La ingesta de *P. multocida* través del agua de bebida o de animales muertos por Cólera Aviar es una importante vía de transmisión a las poblaciones de aves silvestres susceptibles (Morishita et al., 1997). Quortrup (1946) demostró que un lote de patos sanos (*Anas platyrhynchos*) murió por Cólera Aviar luego de compartir el agua de bebida con patos enfermos. Pabs-Garnon (1971) reprodujo la experiencia en pavos y concluyó que las aves contrajeron la enfermedad a través del agua de bebida.

En Nebraska, se demostró que la persistencia de *P. multocida* se debía a la contaminación del agua con carcasas de aves muertas por Cólera Aviar. Si bien no existen datos concretos que demuestren que en Nebraska el agua es un reservorio de *P. multocida*, Price y Brand (1984) comprobaron que las epornitias cesaron cuando no se aisló *P. multocida* de los cuerpos de agua dulce.



Otra fuente de infección de *P. multocida* puede ser la predación o carroñeo de animales enfermos. Una prueba que confirma esta hipótesis fue aportada por Rosen y Morse (1959), al demostrar que luego de una epizootia de Cólera Aviar en aves acuáticas, se presentó un brote de Pasteurelisis en ratones silvestres (*Microtus montanus*). Posteriormente, se hallaron búhos (*Asio flammeus*) y gavilanes (*Circus cyaneus*) muertos por Cólera Aviar, y en el contenido estomacal de estas aves se encontraron ratones silvestres. Asimismo, Taylor (1981) aisló *P. multocida* de cuervos muertos por Cólera Aviar que se habían alimentado con carcasas de patos muertos en una epizootia en Texas.

### **1.3. COLERA AVIAR EN AVES ANTÁRTICAS Y SUBANTÁRTICAS**

Entre las enfermedades infecciosas que afectaron a las aves antárticas y subantárticas, el Cólera Aviar es la única que pudo comprobarse mediante el aislamiento del agente etiológico. El primer registro lo realizaron Parmelee et al. (1979), quienes describieron la mortalidad de 4 parejas de skuas en un período de 5 días. Las carcasas de estos animales se remitieron a EE.UU. donde se aisló e identificó *P. multocida* A:1.

De Lisle et al. (1990) publicaron el primer reporte de Cólera Aviar en pingüinos rockhopper de la Isla Campbell, en la región Subantártica de Australia. En dicha publicación, se describieron muertes aisladas de pingüinos rockhopper entre los años 1985 y 1987. Las carcasas presentaron buen estado corporal, el estómago lleno, y las lesiones más sobresalientes fueron hemorragias generalizadas. En 1985-1986, se aisló *P. multocida* serotipo 1 de los pulmones de 12 pichones de pingüinos, y en 1986-1987 solo 2 ejemplares murieron por Cólera Aviar. Los autores concluyeron que *P. multocida* pudo ser una infección natural y que la enfermedad no afectó a la población de pingüinos rockhopper.

Durante el verano del año 1999-2000, se halló muerto un ejemplar adulto de petrel gigante del sur en Península Potter, Isla 25 de Mayo, Shetland del Sur. La necropsia y el análisis microbiológico de la carcasa se realizaron *in situ*. Las lesiones macro y microscópicas fueron compatibles con Cólera Aviar. Del corazón, hígado y pulmón se aisló *P. m. gallicida* tipo A:1; y de las membranas serosas se aisló *E. coli* no patogénica, probablemente por contaminación *post mortem* (Leotta et al., 2003).

### **1.3.1. MORTALIDAD DE AVES EN BAHIA ESPERANZA**

Entre los años 1980 y 2003, durante los meses de verano se registraron 5 mortalidades de aves en Bahía Esperanza, detalladas a continuación en orden cronológico.

- 1981. Durante los primeros meses de 1981 se encontraron 12 skuas muertos alrededor de un cuerpo de agua dulce, se consideró que las aves no presentaban evidencia de enfermedad y por lo tanto no se determinó la causa de la mortalidad (Montalti y Coria, 1996).
- 1990. Durante la temporada reproductiva 1989-1990 se hallaron 38 skuas muertos en áreas cercanas a un cuerpo de agua dulce. Se remitieron 10 carcasas al Instituto Antártico Argentino, donde se realizaron estudios para la detección de metales pesados. Lamentablemente no se realizaron estudios patológicos ni microbiológicos. Los autores concluyeron en que los skuas no murieron intoxicados por metales pesados, y sugirieron que la causa de la mortalidad pudo ser una enfermedad infecciosa (Montalti y Coria, 1996).
- 1997. Durante el mes de febrero de 1997 se hallaron 23 skuas muertos en torno de un cuerpo de agua dulce estancada. Las carcasas se congelaron y remitieron luego de 6 meses, a la Facultad de Ciencias Veterinarias (UNLP) donde se realizó la necropsia de los ejemplares. Las lesiones observadas fueron compatibles con un cuadro subagudo de Cólera Aviar, a excepción

de la tráquea donde se observó oclusión de la luz con un material fibroso de color amarillo en 4 skuas. En el análisis histopatológico se observó micelio filamentoso tabicado y ascosporas en la luz traqueal y en los pulmones de 11 carcasas. Además, se realizó un minucioso análisis microbiológico, aislándose únicamente *Thelebolus microsporus*, un ascomiceto que esporula a 5°C, y que no crece a 37 ni a 41°C. Se consideró que *T. microsporus* no fue el agente etiológico en la mortalidad de skuas, aunque creció excesivamente en las carcasas favorecido por la baja temperatura y el aporte de materia orgánica. Además, se consideró que la negatividad de los cultivos bacterianos se debió al tiempo transcurrido entre la muerte de las aves y el análisis de las carcasas (Leotta et al., 2002).

- 2000. Durante el mes de febrero del año 2000, se hallaron 15 aves muertas en un radio de 100 m alrededor de 2 cuerpos de agua dulce estancada, 13 skuas (Nr) y 2 gaviotas cocineras (Nr). Las carcasas de 8 skuas y 2 gaviotas fueron identificadas, acondicionadas a -20°C y remitidas a la FCV-UNLP. Las lesiones observadas en las carcasas fueron compatibles con un cuadro subagudo de Cólera Aviar. El diagnóstico se confirmó mediante el análisis microbiológico, ya que se aisló *P. multocida gallicida* tipo A:1 de 2 skuas.
- 2001. Durante el año 2000 y como consecuencia del hallazgo reiterado de muertes inusuales en las aves de Bahía Esperanza se propuso realizar la vigilancia epidemiológica del área durante 3 veranos consecutivos. En el transcurso del primer verano se pudo observar, describir y analizar en detalle un brote de Cólera Aviar que afectó a las aves del lugar.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVOS PRIMARIOS**

- 2.1.1. Determinar el origen de los brotes de Cólera Aviar en las poblaciones de aves de Bahía Esperanza, Antártida.
- 2.1.2. Establecer medidas de vigilancia epidemiológica para la detección de Cólera Aviar en las poblaciones de aves antárticas.

### **2.2. OBJETIVOS SECUNDARIOS**

- 2.2.1. Describir y analizar los posibles factores ambientales conducentes a una epizootia de Cólera Aviar en Bahía Esperanza durante los meses de verano de los años 2001, 2002 y 2003.
  - Describir las características del área en estudio.
  - Analizar los factores climáticos.
  - Determinar las características físicas y químicas de los cuerpos de agua dulce.
- 2.2.2. Realizar la vigilancia epizootiológica de las poblaciones de aves en Bahía Esperanza durante los veranos 2000-2001, 2001-2002 y 2002-2003.
  - Determinar la densidad poblacional.
  - Clasificar las poblaciones según sexo, edad, y comportamiento.
  - Identificar posibles reservorios de Cólera Aviar en las poblaciones de aves.
- 2.2.3. Realizar el diagnóstico patológico de las aves halladas muertas.
- 2.2.4. Realizar el diagnóstico microbiológico de las aves halladas muertas.

2.2.5. Realizar el diagnóstico bacteriológico de Cólera Aviar.

- Aislar *P. multocida* a partir de aves enfermas.
- Caracterizar las cepas por métodos fenotípicos.
- Determinar la susceptibilidad de las cepas a diferentes antimicrobianos.
- Subtipificar las cepas por métodos genotípicos.
- Comparar las cepas aisladas en Bahía Esperanza con cepas de diferente origen.

2.2.6. Realizar el diagnóstico diferencial de Cólera Aviar.

2.2.7. Promover estrategias de vigilancia epizootiológica para el estudio de Cólera Aviar en aves antárticas y evaluar su aplicación para el análisis de otras enfermedades con características epizootiológicas similares que puedan acontecer en el ecosistema antártico.

### **3. MATERIALES Y METODOS**

#### **3.1. AREA DE ESTUDIO**

##### **Bahía Esperanza (63° 24'S, 56° 59'O)**

Los planes de manejo y permisos necesarios para realizar los muestreos fueron otorgados por la Dirección Nacional del Antártico conforme a criterios que garantizan la protección de las especies animales y vegetales allí presentes.

##### **3.1.1. Descripción de Bahía Esperanza**

En noviembre y diciembre del año 2000 se realizó el reconocimiento del área de trabajo mediante la ubicación de accidentes geográficos, glaciares y construcciones realizadas por el hombre (Figura 2).

##### **3.1.2. Análisis de los cuerpos de agua dulce**

En noviembre y diciembre del año 2000 se seleccionaron 10 cuerpos de agua dulce en base a las siguientes características: a) aporte orgánico de la colonia reproductiva de pingüino Adelia, b) asentamiento de aves voladoras, c) distancia del mar, d) tamaño, y e) hallazgo de aves muertas. A cada cuerpo de agua dulce seleccionado se le asignó un número (Tabla 2. Figura 7). Durante enero y febrero de los años 2001, 2002 y 2003, se registraron las características físicas, químicas, y organolépticas de los cuerpos de agua dulce. Durante los veranos 2000-2001 y 2002-2003, se realizó el análisis microbiológico de los cuerpos de agua dulce. Sin embargo, en el verano 2001-2002 no se realizó dicho análisis debido a la imposibilidad de enviar personal calificado para tal fin a Bahía Esperanza. Durante el verano 2002-2003 los cuerpos de agua dulce 1 y 2 no se formaron, debido a cambios geomorfológicos, por lo cual se escogieron 2 nuevos cuerpos de agua dulce (11 y 12) para completar el estudio (Tabla 2. Figura 7).

Para determinar el pH y la temperatura se utilizó el equipo Hanna HI8314 (Hanna Instruments Argentina S.A., Buenos Aires, Argentina), y para determinar la salinidad se utilizó el equipo Hanna HI8033 (Hanna Instrument Argentina). De cada cuerpo de agua dulce seleccionado se colectaron 3 muestras de 250 ml cada una. Se sembraron 100 µl de cada muestra por duplicado en agar selectivo para el aislamiento de *P. multocida* (PMSA) (Moore et al., 1994) y en agar base sangre (Difco, Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) adicionado con 5% de sangre de carnero, incubándose las placas a 37°C durante 24-48 h. La caracterización fenotípica de los aislamientos, la susceptibilidad a los antimicrobianos y la subtipificación molecular de los mismos se realizó simultáneamente con las cepas aisladas de las aves.

### **3.1.3. Climatología**

En enero y febrero de los años 2001, 2002 y 2003, se registraron diariamente las siguientes variables climáticas: a) temperatura ambiental, b) precipitaciones (lluvia y nieve), y c) viento. Los registros fueron provistos por la Estación del Servicio Meteorológico Nacional que se encuentra ubicada en la Base Antártica Esperanza.

## **3.2. VIGILANCIA EPIZOOTIOLÓGICA**

### **3.2.1. Población de aves**

En enero y febrero del año 2000 se localizaron los sitios de asentamiento de skuas, gaviota cocinera, paloma antártica, pingüino Adelia y pingüino papua (Figura 8). El día 15 de febrero se realizaron censos no programados sobre dichos asentamientos.

Durante noviembre del año 2000 y febrero del año 2001; noviembre del año 2001 y febrero del año 2002; y noviembre del año 2002 y febrero del año 2003, se realizaron censos poblacionales programados en el área de Bahía Esperanza. Para ello se trazaron 4 transectas de 1.000 a 3.000 metros de longitud, a través de las cuales se realizaron recorridas cada 7 días a lo

largo de las colonias reproductivas.

Las especies estudiadas fueron skua, gaviota cocinera, pingüinos papua y paloma antártica. Además, se realizó el censo de las aves voladoras no reproductivas por recuento directo en los sitios de asentamiento. Se colectaron datos observacionales por conteo directo del número de nidos activos, parejas reproductivas, huevos y aves no reproductivas. Las parejas reproductivas y las aves no reproductivas fueron censadas entre el 1 de noviembre y el 28 de febrero. Los datos obtenidos correspondientes a huevo y pichón fueron clasificados en períodos de postura (1 de noviembre al 31 de diciembre) y de cría (29 de noviembre al 31 de enero). Las gaviotas cocineras no reproductivas fueron clasificadas según su origen en “población estable” aquellas aves que arribaron a Bahía Esperanza entre el 1 de noviembre y el 31 de diciembre, y “población esporádica” aquellas aves que arribaron entre el 31 de diciembre y el 28 de febrero. Finalmente se obtuvo el promedio de los datos recolectados según el período. Para complementar la descripción realizada, se confeccionaron mapas, los cuales fueron actualizados según los datos recogidos en los veranos 2000-2001, 2001-2002 y 2002-2003.

No se realizó el censo poblacional de la colonia de pingüinos Adelia, y se consideró que dicha población estuvo representada por aproximadamente 124.000 parejas reproductivas (Myrcha et al., 1987). El total de adultos reproductivos y pichones fue estimado en 372.000 aves, considerando la probabilidad de éxito reproductivo en 0,50.

### **3.2.2. Recolección de aves muertas**

Entre noviembre del año 2000 y febrero del año 2001; noviembre del año 2001 y febrero del año 2002; y noviembre del año 2002 y febrero del año 2003, se realizaron recorridas periódicas a los asentamientos de aves en Bahía Esperanza mediante 10 transectas que abarcaron todas las áreas reproductivas, incluyendo la colonia de pingüinos Adelia y los sitios de asentamiento de aves no



reproductivas. Se recogieron las carcasas de aves halladas muertas, y se describieron los signos de las aves moribundas. Los datos de cada carcasa colectada fueron detallados en una ficha para el registro de cada necropsia (Anexo II).

Las carcasas recolectadas entre noviembre del año 2001 y febrero del año 2002 fueron identificadas, congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  y remitidas para su análisis a la Facultad de Ciencias Veterinarias (FCV-UNLP). El análisis de las carcasas halladas durante los veranos 2000-2001 y 2002-2003 se realizó en Bahía Esperanza.

### **3.3. DIAGNOSTICO PATOLOGICO**

La totalidad de las carcasas halladas durante los veranos 2000-2001, 2001-2002 y 2002-2003, fue analizada macroscópicamente por la técnica de necropsia específica para aves (Petruccelli y Menéndez, 1997); mediante la cual fue posible determinar el sexo de las aves muertas, ya que las especies analizadas no presentan dimorfismo sexual. Durante la realización de la necropsia fueron tomadas muestras de tejido para estudios microbiológicos e histopatológicos.

Muestras de tráquea, pulmón, esófago, estómago, intestino, corazón, bazo, hígado y riñón de las carcasas colectadas durante los 2 brotes fueron fijadas en formol bufferado al 10% para estudios histopatológicos. Posteriormente las muestras fueron embebidas en parafina, seccionadas (5-6  $\mu\text{m}$ ) y teñidas con hematoxilina y eosina (HE) (Alwyk, Buenos Aires, Argentina), y ácido periódico Schiff (PAS). Los cortes fueron observados con microscopio óptico a 100X y 450X.

### **3.4. DIAGNOSTICO MICROBIOLOGICO**

#### **3.4.1. Aislamiento de *Pasteurella multocida***

##### **3.4.1.1. Muestras de aves halladas muertas**

Muestras de cavidad buco-faríngea, hígado, pulmón, bazo, y corazón, de todas las carcasas halladas durante los veranos 2000-2001, 2001-2002 y 2002-2003, fueron sembradas en agar selectivo para aislamiento de *P. multocida* (PMSA) (Moore et al., 1994) y en agar base sangre (Difco, Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) adicionado con 5% de sangre de carnero, incubándose a 37°C durante 48 h.

#### **3.4.1.2. Muestras de aves vivas sin manifestación de enfermedad**

Durante los veranos 2000-2001 y 2002-2003, se analizaron muestras de cavidad buco-faríngea de aves sin manifestación clínica de Cólera Aviar para identificar posibles reservorios de *P. multocida*. Para la toma de muestras se utilizaron hisopos estériles incluidos en medio de transporte Stuart (Difco). El criterio de selección utilizado para designar las especies a analizar se basó en las características migratorias y alimenticias de las aves. Se tomaron 30 muestras de cada especie, este tamaño muestral brinda un 95% de confianza para la detección de por lo menos un resultado positivo si la prevalencia de infección por *P. multocida* es del 10% como mínimo. A continuación se enumeran las 3 especies analizadas y las principales características contempladas.

- a) Skuas: arriban a Bahía Esperanza desde otros Continentes del Hemisferio Sur, su dieta está constituida principalmente por pingüinos, huevos y peces.
- b) Pingüinos Adelia: son aves nadadoras y no se conocen sus rutas migratorias, se alimentan de krill.
- c) Paloma antártica: parte de la población permanece todo el año en Bahía Esperanza asociada a la Base Antártica Esperanza, su conducta alimenticia se basa en el carroño.

Las aves fueron capturadas al azar y muestreadas en enero y febrero del año 2001, y enero y febrero del año 2003. Las muestras fueron sembradas en PMSA (Moore et al., 1994) por duplicado e incubadas a 37°C durante 48 h.

#### **3.4.2. Caracterización fenotípica e identificación de los aislamientos de *P. multocida***

Los aislamientos de *P. multocida* de las aves y de los cuerpos de agua dulce fueron identificados mediante la utilización del micrométodo comercial API20E (BioMerieux, St. Louis, Missouri, EE.UU.). La identificación de especie y subespecie fue confirmada por las características tintoriales, morfológicas y bioquímicas de los aislamientos (Koneman et al., 1999) (Tabla 1). La clasificación taxonómica se confirmó mediante la secuenciación del gen 16S ARNr según la técnica descrita por Dewhirst et al. (1993).

Se realizó la coloración de Gram (Britania, Buenos Aires, Argentina) y las siguientes determinaciones: hemólisis (agar base sangre [Difco] adicionado con 5% de sangre de carnero), catalasa (Difco), citocromo oxidasa (Mac Faddin, 1980), crecimiento en agar MacConkey (Difco), nitrato (Mac Faddin, 1980), indol (agar sulfuro indol movilidad, Difco), ornitina decarboxilasa (Difco) y urea (Difco). Cada aislamiento fue inoculado en caldo base rojo de fenol (Difco) conteniendo 1% de los siguientes carbohidratos (ICN Biomedicals, Aurora, Ohio, EE.UU.): glucosa, manosa, arabinosa, dulcitol, lactosa, maltosa, manitol, sacarosa, trehalosa, sorbitol y xilosa. Los caldos inoculados fueron incubados a 37°C y examinados a las 24 h, 48 h, y a los 7 días. El biotipo fue determinado según descripciones previas (Mutters et al., 1985; Fegan et al., 1995) (Tabla 3).

La secuenciación del gen 16S ARNr, la determinación del tipo capsular y del serotipo somático la realizó el Dr. Mark Wolcott en el Laboratorio de Diagnóstico Microbiológico USGS - Natural Wildlife Health Center, Madison, Wisconsin, EE.UU.

La tipificación capsular se realizó según el esquema propuesto por Carter et al. (1955) y actualizado por Brogden et al. (1979). Para determinar el tipo capsular se utilizó una técnica de PCR múltiple descrita previamente por Townsend et al. (2001), utilizando oligonucleótidos (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, EE.UU.) (Tabla 4) y reactivos específicos (Amersham Biosciences Corp. Piscataway, NJ, EE.UU.).

La serotipificación somática de los aislamientos de *P. multocida* fue realizada mediante la técnica de inmunodifusión, acorde a la metodología descrita por Heddleston et al. (1972) utilizando antisueros provistos por National Veterinary Services Laboratory (Ames, IA, EE.UU.).

Las cepas fueron conservadas a -70°C en caldo cerebro corazón (Difco, Detroit, Michigan, EE.UU.) adicionado con 30% de glicerol (ICN), y depositadas en el Laboratorio de Diagnóstico e Investigaciones Bacteriológicas (FCV-UNLP), en el Servicio Fisiopatogenia del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI)-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán", y en Laboratorio de Diagnóstico Microbiológico USGS Madison, Wisconsin, EE.UU.

#### **3.4.3. Susceptibilidad de las cepas de *Pasteurella multocida* a diferentes antimicrobianos**

Se determinó la susceptibilidad de las cepas de *P. multocida* aisladas de las aves y de los cuerpos de agua dulce a diferentes antimicrobianos (ATB) mediante la técnica de concentración inhibitoria mínima (CIM), utilizando la técnica de microdilución en caldo. Se utilizaron los siguientes antimicrobianos: aivlosin (Vetanco S.A., Vicente López, Buenos Aires, Argentina), ampicilina (ICN), cefalotina (ICN), ceftiofur sódico (Vetanco), enrofloxacin (Vetanco), estreptomycin (Wako Pure Chemical Ltd., Osaka, Japón), florfenicol (Vetanco), gentamicina

(ICN), tetraciclina (ICN), tiamulina (Laboratorios Aviar, Buenos Aires, Argentina), y tilosina (Laboratorios Aviar). Se determinó un rango de trabajo, expresado en µg/ml, para cada antimicrobiano (Tabla 5).

La cantidad de droga a utilizar para realizar la CIM se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{ATB (mg)} = \frac{\text{volumen de diluyente (ml)} \times \text{concentración de ATB deseada (µg/ml)}}{\text{Potencia del ATB (µg/ml)}}$$

Las cepas *E. coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 se utilizaron como controles. Se utilizó la metodología de trabajo propuesta por el Comité Nacional de Estándares para Laboratorio Clínico (NCCLS M7-A6), y cada cepa se evaluó por duplicado. La interpretación de los resultados se realizó acorde a los valores definidos para *P. multocida* según el Comité Nacional de Estándares para Laboratorio Clínico (NCCLS M31-A2 y M7-A6), a excepción de gentamicina (acorde a los valores para *otras bacterias no-Enterobacteriaceae*), ampicilina, tetraciclina (acorde a los valores definidos para la Familia *Enterobacteriaceae*), tiamulina (acorde a los valores para *Actinobacillus pleuropneumoniae*) y estreptomycinina (acorde a los valores para *E. coli* según NORM/NORM-VET 2002) (Tabla 5). Hasta el presente no se encuentran estandarizados los valores de corte para los macrólidos aivosin y tilosina.

#### **3.4.4. Subtipificación molecular de las cepas de *Pasteurella multocida***

Las cepas de *P. multocida* aisladas durante el brote de Cólera Aviar ocurrido en el verano 2000-2001, fueron subtipificadas por ERIC-PCR y PFGE.

La técnica de ERIC-PCR fue realizada según lo descrito por Amonsin et al. (2002). Un ml de cultivo de *P. multocida* en caldo cerebro corazón, luego de una incubación a 37°C durante 18 h (OD<sub>620</sub>: 0,5 ml de cultivo) fue utilizado para la extracción y purificación de ADN genómico

por el kit Wizard™ (Promega). Los oligonucleótidos utilizados para generar los perfiles de ADN fueron: ERIC1R (5' ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC) y ERIC2 (5' AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG) (Biodynamics, Miami, Florida, EE.UU.). Los fragmentos obtenidos fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 2% (Invitrogen Life Technologies, Brasil) conteniendo bromuro de etidio (2 µg/ml) (Promega). La corrida electroforética fue realizada en buffer tris acetato EDTA 1X por 3,5 h a 80 volts; el marcador de peso molecular utilizado fue 1 kb DNA Ladder (Promega).

La técnica de PFGE fue realizada según el protocolo del *Center for Disease Control and Prevention* CDC (1998), con algunas modificaciones basadas en los protocolos propuestos por Gunawardana et al. (2000) y Pedersen et al. (2003). Los bloques de agarosa (*plugs*) conteniendo el ADN de cada cepa fueron digeridos con 40 U de la enzima de restricción *ApaI* (Promega, Madison, WI, EE.UU.). El marcador de peso molecular utilizado fue Lambda Ladder PFGE Marker (New England BioLabs, Beverly, MA, EE.UU.). Los fragmentos de ADN fueron separados en un gel de agarosa al 1,2 % (Pulsed Field Certified Agarose, BioRad, Hercules, CA, EE.UU.) en buffer tris borato EDTA 0,5X a 14°C, en una cámara de electroforesis CHEF-DR III system (BioRad). El tiempo de corrida fue de 22 h, con un voltaje constante de 170 V, utilizando un pulso lineal rampeado de 1-30 seg. La tinción del gel se realizó con 0,5 µg/ml de solución de bromuro de etidio (BioRad). Como segunda enzima de restricción se utilizó *SmaI* (40 U) (Promega), con un pulso lineal rampeado de 0,5-40 seg por 22,5 h; la cepa de referencia CDC H-9812 *Salmonella* Braenderup, fue incluida como marcador de peso molecular.

Los perfiles moleculares obtenidos por ERIC-PCR y PFGE fueron fotografiados utilizando el equipo Kodak Digital Science 1D™, y fueron analizados con el software BioNumerics versión 3.5 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). La relación entre los perfiles fue

estimada por la proporción de bandas compartidas aplicando el coeficiente de Dice y generando dendrogramas basados en el método *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (UPGMA). Los patrones moleculares obtenidos por ERIC-PCR fueron agrupados en clusters o grupos clonales con una similitud superior al 85% y los patrones moleculares obtenidos por *ApaI*-PFGE fueron agrupados en clusters con una similitud superior al 80%. El trabajo se realizó en el Servicio Fisiopatogenia, INEI - ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”.

#### **3.4.5. Cepas de *Pasteurella multocida* de diferente origen**

Para comparar los resultados obtenidos con las cepas de *P. multocida* aisladas en Bahía Esperanza, se analizaron 41 cepas de *P. multocida* de diferente origen:

- a) 3 cepas aisladas en la Antártida, 2 en el brote de Cólera Aviar del año 2000 en Bahía Esperanza y una aislada de un petrel gigante del sur durante el verano del año 2000 en la Isla 25 de Mayo, Shetland del Sur (Leotta et al., 2003).
- b) 17 cepas de referencia, 16 provistas por National Animal Disease Center (NADC), y la cepa ATCC 51689 provista por el Dr. P. J. Blackall (Queensland Poultry Research and Development Centre, Animal Research Institute, Moorooka, Australia).
- c) 11 cepas aisladas de gallinas reproductoras con Cólera Aviar crónico, 9 de la República Argentina, una de la República Oriental del Uruguay (provistas por el Dr. J. L. Garbi); y una proveniente de Australia (provista por el Dr. P. J. Blackall).
- d) 10 cepas aisladas de cerdos de la Provincia de Buenos Aires (Provistas por el Laboratorio de Diagnóstico e Investigaciones Bacteriológicas, FCV-UNLP).

Mediante la metodología descrita en el punto 3.4.2 se confirmó la identificación bioquímica, el tipo capsular y el serotipo somático de las cepas de *P. multocida* de diferente origen (Tabla 6). Para determinar la susceptibilidad a los antimicrobianos y el subtipo molecular

se utilizó la metodología descrita en los puntos 3.4.3. y 3.4.4. Solamente se analizaron por *SmaI*-PFGE las cepas aisladas en la Antártida.

### **3.4.6. Evaluación de las técnicas de subtipificación**

Se determinó el poder discriminatorio a cada una de las técnicas de subtipificación utilizadas (Maslow et al., 1993), para evaluar la capacidad de diferenciar cepas sin relación epidemiológica. Para dicha evaluación se utilizaron 41 cepas de *P. multocida*: 3 cepas aisladas en la Antártida (una aislada de pingüino Adelia durante el verano 2001, una aislada de skua durante el verano 2000 y una cepa aislada de un petrel gigante del sur muerto por Cólera Aviar en la Isla 25 de Mayo, Islas Shetland del Sur) y 38 cepas de diferente origen (punto 3.4.5).

El poder discriminatorio de las técnicas fue determinado mediante el índice de Simpson (Hunter y Gaston, 1988).

$$\text{Índice de Simpson} \quad D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \times \sum_{j=1}^s x_j(x_j-1)$$

N = número total de aislamientos estudiados

$x_j$  = número de aislamientos en el tipo  $j$

s = número de tipos diferentes

## **3.5. DIAGNOSTICO MICROBIOLOGICO DIFERENCIAL DE COLERA AVIAR**

Se realizó el diagnóstico microbiológico diferencial a todas las aves muertas por Cólera Aviar entre enero y febrero del año 2001. Para ello se recolectaron muestras de cavidad buco-faríngea, hígado, tráquea, pulmón, bazo, corazón y contenido intestinal.

### **3.5.1. Muestras de aves halladas muertas**

Muestras de cavidad buco-faríngea, hígado, tráquea, pulmón, bazo y corazón fueron sembradas en agar chocolate y en agar MacConkey (Difco), e incubadas a 37°C durante 24-48 h para el



aislamiento de *Avibacterium paragallinarum* y *Escherichia coli*, respectivamente. Además, se sembraron muestras de hígado y contenido intestinal en agar entérico hektoen (Becton Dickinson France S.A., France) y se incubaron a 37°C durante 24 h para el aislamiento de enterobacterias productoras de hidrógeno sulfurado.

Muestras de tráquea y pulmón, de 23 skuas que presentaron lesiones en el tracto respiratorio, fueron sembradas en medio líquido y sólido de Frey (Frey et al., 1968), e incubadas a 37°C en atmósfera microaerófila durante 7 días, para el aislamiento de *Mycoplasma* spp. Las mismas muestras, fueron analizadas mediante inmunofluorescencia directa (Chlamydia Test Direct IF, BioMerieux) para detección de *Chlamydia psittaci*.

### **3.5.2. Identificación de *Escherichia coli***

Los aislamientos de *E. coli* fueron identificados mediante sus características tintoriales, morfológicas y bioquímicas (Edwards y Ewing, 1984). Se realizaron las siguientes determinaciones: hemólisis (agar base sangre [Difco] adicionado con 5% de sangre de carnero), catalasa (Difco), citocromo oxidasa (Mac Faddin, 1980), rojo de metilo (Difco), Voges Proskauer (Difco), agar triple azúcar hierro (Difco), urea (Difco), lisina decarboxilasa (agar lisina hierro, Difco), ornitina decarboxilasa (Difco), indol (agar sulfuro indol movilidad, Difco), movilidad (agar sulfuro indol movilidad, Difco), y citrato (Difco). Cada aislamiento fue inoculado en caldo base rojo de fenol (Difco) conteniendo 1% de los siguientes carbohidratos (ICN): glucosa, lactosa, y sorbitol.

Una vez identificadas, las cepas se remitieron al Servicio Fisiopatogenia (INEI-ANLIS ‘‘Dr. Carlos G. Malbrán’’ ) para su caracterización. Mediante PCR se determinaron los siguientes marcadores de virulencia: intimina de *E. coli* enteropatógeno (EPEC); toxina termolábil (LT) y termoestable (ST) de *E. coli* enterotoxigenico (ETEC); toxinas Shiga 1 y 2 de *E. coli* productor

de toxina Shiga (STEC); enterohemolisina de *E. coli* enterohemorrágico (EHEC); y plásmido enteroagregativo de *E. coli* enteroagregativo (EaggEC) (Chinen et al., 2002). Asimismo, se realizó el ensayo de *colony-blot* para la determinar el *bundle-forming pilus* (BFP) de EPEC y la fimbria Daa de *E. coli* de adherencia difusa (DAEC). Para identificar cepas de *E. coli* enteroinvasivo (EIEC), se utilizó la técnica de ELISA para la detección de la invasina (Chinen et al., 2002). Las cepas fueron conservadas a -70°C en caldo cerebro corazón (Difco) adicionado con 30% de glicerol (ICN), y depositadas en el Laboratorio de Investigaciones y Diagnóstico Bacteriológico (FCV-UNLP) y en el Servicio Fisiopatogenia (INEI-ANLIS ‘‘Dr. C. G. Malbrán’’).

### **3.5.3. Identificación de bacterias productoras de hidrógeno sulfurado**

Los aislamientos de bacterias productoras de hidrógeno sulfurado, diferenciados en agar entérico hektoen, fueron identificados mediante características tintoriales (coloración de Gram, Britania), morfológicas y bioquímicas (Edwards y Ewing, 1984). Se realizaron las siguientes determinaciones: catalasa (Difco), citocromo oxidasa (Mac Faddin, 1980), rojo de metilo (Difco), Voges Proskauer (Difco), hidrógeno sulfurado (agar triple azúcar hierro, Difco), urea (Difco), lisina decarboxilasa (agar lisina hierro, Difco), ornitina decarboxilasa (Difco), indol (agar sulfuro indol movilidad, Difco), movilidad (agar sulfuro indol movilidad, Difco), citrato (Difco), y malonato (Merck Química, Buenos Aires, Argentina). Cada aislamiento fue inoculado en caldo base rojo de fenol (Difco) conteniendo 1% de los siguientes carbohidratos (ICN): glucosa, lactosa, dulcitol, salicina, rafinosa, sorbitol, arabinosa, maltosa, xilosa, trehalosa y sacarosa. Las cepas fueron conservadas a -70°C en caldo cerebro corazón (Difco) adicionado con 30% de glicerol (ICN), y depositadas en el Laboratorio de Investigaciones y Diagnóstico Bacteriológico (FCV-UNLP).

#### **3.5.4. Análisis micológico**

Se realizó la observación directa de improntas de los órganos sospechosos al microscopio óptico. Para el aislamiento de *Eumycetes*, se sembraron muestras de traquea y pulmón de aves con lesiones en el tracto respiratorio (skuas), en agar Sabouraud dextrosa (Difco) con la adición de cloranfenicol (Sigma) y 2% de extracto de levaduras (Difco), incubándose a 28°C y 37°C durante 10 días. Los hongos miceliales fueron identificados por sus características macro y micromorfológicas (Leotta et al., 2002). Los aislamientos identificados fueron depositados en la Cátedra de Micología Médica e Industrial (FCV-UNLP) y en el Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Utrecht, Holanda.

#### **3.5.5. Análisis virológico**

Muestras de pulmón y contenido intestinal de las aves muertas por Cólera Aviar entre enero y febrero del año 2001 fueron conservadas en *Medium Englin Minimum* (MEM, Gibco, Carlsbad, CA, EE.UU.) adicionado con aminoácidos (Gibco), suero fetal bovino (Gibco) y solución de antibióticos (Gibco); las mismas fueron congeladas a -20°C y remitidas a la FCV-UNLP.

Las muestras fueron tratadas con solución de antibióticos y antimicóticos (Gibco), y resuspendidas con jeringa y aguja. Posteriormente fueron filtradas utilizando filtros de 0,22 µ de diámetro (Renner GMBH, Dannstadt, Germany) y conservadas a -70°C.

Para el diagnóstico de Bronquitis Infecciosa, Laringotraqueítis, Influenza y Enfermedad de Newcastle, se inocularon por triplicado 100 µl de cada muestra pulmonar, en huevos embrionados de gallina de 9 a 11 días, vía cavidad alantoidea y membrana corioalantoidea. Los huevos se sellaron con parafina y se incubaron a 37°C. Luego de 5 días posinoculación se analizaron los embriones, se colectó el líquido alantoideo y se realizó la prueba de hemoaglutinación en placa (Taller sobre Evaluación de Infecciones por Virus Influenza mediante

Técnicas Serológicas, 2001), utilizando glóbulos rojos de gallina al 0,5%. Por cada muestra se realizaron 3 pasajes en huevo embrionado de gallina de 9 a 11 días. El trabajo se realizó en los laboratorios del Departamento de Aves de SENASA-DILACOT, en condiciones de bioseguridad tipo II. Para evidenciar la presencia de virus Influenza tipo A se realizó la técnica de inmunofluorescencia indirecta utilizando el kit Imagen Influenza A y B (Chemicon, Temecula, CA, EE.UU.). El trabajo se realizó en el Servicio Virosis Respiratorias, INEI – ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”.

### **3.6. PROCESAMIENTO DE LA INFORMACION**

Se realizó un estudio observacional prospectivo de las variables ambientales con posible asociación a la presentación de Cólera Aviar: temperatura ambiental, precipitaciones (nieve y lluvia) y viento. Los resultados obtenidos fueron analizados mediante pruebas no paramétricas de significación estadística. El análisis se realizó mediante el test de correlación de Spearman y Kruskal-Wallis. Se trabajó con una significación del 95% y un error de 0,05. El nivel de significación estadística fue de  $p \leq 0,05$ .

Simultáneamente, se realizó un estudio observacional prospectivo de las poblaciones de skuas, gaviotas cocineras, pingüinos papua y palomas antárticas. Se recolectaron datos de las siguientes variables: densidad poblacional, composición etaria (adulto reproductivo, adulto no reproductivo y pichón) y características migratorias (voladoras y nadadoras).

En las poblaciones de aves estudiadas se determinó la tasa de mortalidad general sin discriminar la etiología, y la tasa de mortalidad por Cólera Aviar. Con los datos obtenidos se trazó la curva temporal epizoótica de Cólera Aviar entre enero y febrero del año 2001, y con los datos obtenidos en los años 2002 y 2003 se trazaron curvas de mortalidad diaria. La presentación de tendencia de la serie cronológica se realizó mediante la suavización de la misma utilizando

promedios móviles. Los resultados obtenidos fueron analizados y consolidados mediante pruebas no paramétricas de significación estadística. Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el test de Chi cuadrado. Se trabajó con una significación del 95% y un error de 0,05. El nivel de significación estadística fue de  $p \leq 0,05$ .

## **4. RESULTADOS**

### **4.1. AREA DE ESTUDIO**

Bahía Esperanza se encuentra ocupada por glaciares a excepción de un área libre de hielo en la región Sur. Esta área presenta una extensión aproximada de 10 km<sup>2</sup>, el límite Sudoeste limita con el Glaciar Depósito y el margen Noreste con la zona del Faro. En la costa Norte, la Península Esperanza separa Caleta Aguila de Caleta Choza, y en el límite Sur se encuentra el cerro Scar con una altura aproximada de 100 m. Sin embargo, la montaña más importante en el área es el Monte Flora con una altura de 528 m (Figura 2).

#### **4.1.1. Hidrología**

Entre enero y febrero de los años 2001, 2002 y 2003, los cuerpos de agua dulce de Bahía Esperanza estuvieron representados por: 6 chorrillos de deshielo; 7 lagos permanentes; 5 estanques; 4 charcas temporarias en los años 2001 y 2002 (Figura 7), y 11 charcas en el año 2003 (Figura 9).

##### **4.1.1.1. Descripción de los cuerpos de agua dulce analizados**

**Cuerpo de agua dulce 1.** Charca ubicada a 30 m del mar, presenta 2 m de largo, 1,5 m de ancho, y drena su caudal al cuerpo de agua dulce 2. El fondo contiene una gran cantidad de sedimento orgánico aportado por los residuos de la colonia reproductiva de pingüino Adelia y de algas marinas. El agua es principalmente dulce debido al constante aporte glaciario. En el año 2003 no se formó esta charca debido a cambios geomorfológicos (Figura 10).

**Cuerpo de agua dulce 2.** Charca ubicada a 30 m del mar, presenta 4 m de largo, 2 m de ancho, y recibe aporte de agua de la charca vecina (cuerpo de agua dulce 1) y por lo tanto de la colonia reproductiva de pingüino Adelia. El fondo se encuentra formado principalmente por piedras,

debajo de las cuales hay material orgánico y muy pocas algas. En el año 2003 no se formó esta charca debido a cambios geomorfológicos.

En enero y febrero del año 2001, alrededor de los cuerpos de agua dulce 1 y 2, se agruparon las gaviotas y los skuas no reproductivos y se encontraron las aves muertas por Cólera Aviar.

**Cuerpo de agua dulce 3.** Estanque ubicado a 100 m del mar, presenta 30 m de largo, 20 m de ancho y no recibe aporte orgánico de la colonia reproductiva de pingüino Adelia. La presencia de aves voladoras es casual.

**Cuerpo de agua dulce 4.** Estanque ubicado a 100 m del mar, presenta 10 m de largo, 10 m de ancho y no recibe aporte orgánico de la colonia reproductiva de pingüino Adelia. Durante el mes de febrero del año 2000, en torno a este estanque se agruparon las gaviotas y los skuas no reproductivos y se encontraron las carcadas de las aves muertas por Cólera Aviar (Figura 11).

**Cuerpo de agua dulce 5.** Lago ubicado en el pie del Monte Flora a 500 m del mar, presenta 200 m de largo, 100 m de ancho. Recibe aporte de agua de 4 lagos superiores y no recibe aporte orgánico de la colonia reproductiva de pingüino Adelia. Según las características geomorfológicas, este lago puede drenar su caudal hacia un importante chorrillo de deshielo. La presencia de aves voladoras es casual.

**Cuerpo de agua dulce 6.** Estanque ubicado a 600 m del mar, en el centro de la colonia reproductiva de pingüino Adelia, de la cual recibe un gran aporte orgánico. Se encuentra dividido en dos partes, una de ellas presenta 20 m de diámetro y la otra 10 m de largo y 5 m de ancho. Durante el verano 1996-1997, alrededor de este estanque se agruparon las gaviotas y los skuas no reproductivos y se encontraron las aves muertas por Cólera Aviar.

**Cuerpo de agua dulce 7.** Charca ubicada a 40 m del mar, presenta 4 m de largo, 2 m de ancho, y recibe un gran aporte orgánico de la colonia reproductiva de pingüino Adelia.

La presencia de aves voladoras es casual.

**Cuerpo de agua dulce 8.** Lago Boeckella, ubicado a 900 m del mar, presenta 300 m de largo, 150 m de ancho, y recibe escaso aporte orgánico de la colonia reproductiva de pingüino Adelia. Durante los años 1981 y 1990, en torno a este lago se agruparon las gaviotas y los skuas no reproductivos, y se encontraron las carcasas de las aves muertas por Cólera Aviar.

**Cuerpo de agua dulce 9.** Charca ubicada a 70 m del mar, presenta 10 m de largo, 8 m de ancho, y recibe un gran aporte de materia orgánica por parte de la colonia reproductiva de pingüinos Adelia. La presencia de aves voladoras es casual.

**Cuerpo de agua dulce 10.** Estanque ubicado a 400 m del mar, en el centro de la colonia reproductiva de pingüinos Adelia, de la cual recibe un gran aporte orgánico. Presenta un diámetro aproximado de 50 m. La presencia de aves voladoras es casual.

**Cuerpo de agua dulce 11.** Charca ubicada a 100 m del mar, presenta un diámetro aproximado de 7 m y recibe aporte de la colonia reproductiva de pingüinos Adelia. La presencia de aves voladoras es casual. Esta charca solo se analizó en el año 2003 debido a la ausencia de los cuerpos de agua dulce 1 y 2, y a que se encontraba cercana a la zona de asentamiento de las aves no reproductivas.

**Cuerpo de agua dulce 12.** Charca ubicada a 150 m del mar, presenta un diámetro aproximado de 5 m y recibe aporte de la colonia reproductiva de pingüinos Adelia. La presencia de aves voladoras es casual. Esta charca solo se analizó en el año 2003 debido a la ausencia de los cuerpos de agua dulce 1 y 2, y a que se encontraba cercana a la zona de asentamiento de las aves no reproductivas.



Si bien no se analizaron los chorrillos de deshielo, es interesante destacar que durante el verano 2000-2001 el chorrillo A (Figura 7) se mantuvo cubierto por una gran capa de hielo, a diferencia de lo observado en los veranos 2001-2002 y 2002-2003.

#### **4.1.1.2. Características físicas, químicas y microbiológicas de los cuerpos de agua dulce analizados**

Entre enero y febrero del año 2001, la temperatura de los cuerpos de agua dulce se mantuvo entre 1 y 5 °C, el pH entre 6 y 8, y la salinidad entre 0,05 y 8,87 g/l. Durante el brote de Cólera Aviar se aisló *P. m. gallicida* biovar 8 tipo A: 1 en muestras del cuerpo de agua dulce 1. Al momento de la recolección de las muestras la temperatura del agua en la charca fue de 5°C, el pH 7 y la salinidad de 8,73 g/l. Alrededor de esta charca se asentaban las gaviotas y skuas no reproductivos.

Entre enero y febrero del año 2002, la temperatura de los cuerpos de agua dulce se mantuvo entre 1 y 7°C, el pH entre 6 y 7, y la salinidad entre 0,05 y 5,97 g/l.

Entre enero y febrero del año 2003, la temperatura de los cuerpos de agua dulce se mantuvo entre 0,5 y 5°C, el pH entre 6 y 7,5, y la salinidad entre 0,08 y 7,32 g/l.

En las Tablas 7, 8 y 9 se detalla la temperatura, el pH, la salinidad y las características organolépticas de cada cuerpo de agua dulce analizado durante los veranos 2000-2001, 2001-2002 y 2002-2003, respectivamente. Asimismo, en las tablas 7 y 9 se presenta el resultado del análisis microbiológico para el aislamiento de *P. multocida* de cada cuerpo de agua dulce analizado durante los veranos 2000-2001 y 2002-2003, respectivamente.

#### **4.1.2. Climatología**

En enero y febrero del año 2001 la temperatura ambiental promedio fue de -0,27°C, registrándose un máximo de 7°C el 25 de febrero y un mínimo de -7,1°C el 22 de febrero. El promedio de

precipitaciones en forma de nieve fue de 1 cm, registrándose un máximo de 13 cm el 23 de enero y a partir del 10 de febrero no se registraron precipitaciones en forma de nieve. El promedio de lluvia fue de 1,09 mm, con un máximo de 15,5 mm el 22 de enero. La velocidad promedio del viento fue de 46 km/h, registrándose un máximo de 130 km/h el 11 de febrero y un mínimo de 6 km/h el 24 de febrero. En la Tabla 10 (a y b) y en la Figura 12 se detallan los registros diarios de temperatura (máxima, mínima y promedio), precipitaciones (lluvia y nieve) y viento correspondientes a los meses de enero y febrero del año 2001.

En enero y febrero del año 2002 la temperatura ambiental promedio fue de 1,1°C, registrándose un máximo de 4,5°C los días 17 de enero, 13, 17 y 24 de febrero y un mínimo de -4,2°C el 5 de febrero. El promedio de precipitaciones en forma de nieve fue de 0,3 cm, registrándose un máximo de 8 cm el 19 de febrero. El promedio de lluvias fue de 1,3 mm con un máximo de 18,8 mm el 1 de febrero. La velocidad promedio del viento fue de 63 km/h, registrándose un máximo de 133 km/h el 15 de febrero y un mínimo de 12 km/h el 2 de enero. En la Tabla 11 (a y b) y en el Figura 13 se detallan los registros diarios de temperatura (máxima, mínima y promedio), precipitaciones (lluvia y nieve) y viento correspondientes a los meses de enero y febrero del año 2002.

En enero y febrero del año 2003 la temperatura ambiental promedio fue de 1°C, registrándose un máximo de 9,9°C el 1 de enero y un mínimo de -3,9°C el 28 de febrero. El promedio de precipitaciones en forma de nieve fue de 1,1 cm registrándose un máximo de 9 cm el 27 de enero y el 25 de febrero. El promedio de lluvias fue de 1,1 mm con un máximo de 9 mm el 25 de febrero. La velocidad promedio del viento fue de 38 km/h registrándose un máximo de 107 km/h el 15 de febrero y un mínimo de 6 km/h el 13 de enero. En la Tabla 12 (a y b) y en la Figura 14 se detallan los registros diarios de temperatura (máxima, mínima y promedio),

precipitaciones (lluvia y nieve) y viento correspondientes a los meses de enero y febrero del año 2003.

## **4.2. VIGILANCIA EPIZOOTIOLOGICA**

### **4.2.1. Poblaciones de aves en Bahía Esperanza**

#### **4.2.1.1. Población de aves en la temporada reproductiva 2000-2001**

Entre noviembre del año 2000 y febrero del año 2001, 6 especies de aves nidificaron en Bahía Esperanza: gaviota cocinera, skua, paloma antártica, pingüino Adelia, pingüino papua, y petrel de Wilson. En la Figura 15 se detalla la ubicación de los nidos y el sitio de asentamiento de las aves no reproductivas durante enero y febrero del año 2001. A continuación se describe la distribución de las aves en estudio:

**a)** La población de gaviotas cocinera estuvo conformada por 213 ejemplares: 63 (29,6%) adultos reproductivos, 20 (9,4%) pichones y 130 (61%) gaviotas no reproductivas. La población de gaviotas no reproductiva estuvo conformada por 23 (10,8%) gaviotas estables y 107 (50,2%) esporádicas. Estas últimas arribaron a Bahía Esperanza el día 1 de enero del año 2001 y se agruparon en torno a los cuerpos de agua dulce 1 y 2 (Figura 7), compartiendo el nicho ecológico con skuas no reproductivos (Figura 16). En las áreas rocosas de las costas Sudoeste y Noreste de Bahía Esperanza se censaron 24 nidos activos.

**b)** La población total de skuas estuvo conformada por 75 aves: 18 (24%) adultos reproductivos, un (1,3%) pichón y 56 (74,6%) skuas no reproductivos. Estos últimos se agruparon en torno a los cuerpos de agua dulce 1 y 2 (Figura 7). Nueve nidos activos estuvieron distribuidos heterogéneamente en áreas aledañas a la colonia de pingüino Adelia (Figura 15).

**c)** La población de paloma antártica estuvo conformada por 87 aves: 36 (41,4%) adultos reproductivos, 22 (25,3%) pichones y 29 (33,3%) palomas no reproductivas. En la Península Esperanza y en el límite Noroeste de la colonia reproductiva de pingüinos Adelia se censaron 18 nidos activos.

**d)** La población de pingüino papua estuvo conformada por 690 aves: 360 (52,2%) adultos reproductivos, 290 (42%) pichones y 40 (5,8%) pingüinos papua no reproductivos. En la costa Noroeste de Bahía Esperanza se censaron 180 nidos activos.

#### **4.2.1.2. Población de aves en la temporada reproductiva 2001-2002**

Entre noviembre del año 2001 y febrero del año 2002, en Bahía Esperanza nidificaron las mismas especies de aves que en la temporada reproductiva 2000-2001. En la Figura 17 se detalla la ubicación de los nidos y el sitio de asentamiento de las aves no reproductivas durante enero y febrero del año 2002. A continuación se describe la distribución de las aves en estudio:

**a)** La población de gaviotas cocinera estuvo conformada por 172 ejemplares: 66 (38,3%) adultos reproductivos, 18 (10,4%) pichones y 88 (51,1%) gaviotas no reproductivas. Al igual que en los años 2000 y 2001, estas aves nidificaron en áreas rocosas de las costas Sudoeste y Noreste de Bahía Esperanza, donde se censaron 25 nidos activos. La población de gaviotas no reproductiva estuvo conformada por 15 (8,7%) gaviotas estables y 63 (36,6%) migratorias. Estas aves compartieron el nicho ecológico con skuas no reproductivos (Figura 7).

**b)** La población total de skuas estuvo conformada por 108 aves: 32 (29,6%) adultos reproductivos, 6 (5,6%) pichones y 70 (64,8%) skuas no reproductivos. Estos últimos se agruparon en torno al chorrillo A (Figura 7). Dieciséis nidos activos estuvieron distribuidos heterogéneamente en áreas aledañas a la colonia de pingüino Adelia (Figura 16).

**c)** La población de paloma antártica estuvo conformada por 100 aves: 44 (44%) adultos reproductivos, 26 (26%) pichones y 30 (30%) palomas no reproductivas. Se censaron 16 nidos activos en las mismas áreas de nidificación que en la temporada 2000-2001.

**d)** La población de pingüino papua estuvo conformada por 660 aves: 300 (45,4%) adultos reproductivos, 250 (37,9%) pichones y 110 (16,6%) pingüinos papua no reproductivos. En la

costa Noroeste de Bahía Esperanza se censaron 150 nidos activos.

#### **4.2.1.3. Población de aves en la temporada reproductiva 2002-2003**

Entre noviembre del año 2002 y febrero del año 2003, en Bahía Esperanza nidificaron las mismas especies de aves que en las temporadas reproductivas 2000-2001 y 2001-2002. En la Figura 18 se detalla la ubicación de los nidos y el sitio de asentamiento de las aves no reproductivas durante enero y febrero del año 2003. A continuación se describe la distribución de las aves en estudio:

**a)** La población de gaviotas cocinera estuvo conformada por 222 ejemplares: 52 (23,4%) adultos reproductivos, 20 (9%) pichones y 150 (67,6%) gaviotas no reproductivas. Se censaron 25 nidos activos en las mismas áreas de nidificación que en las temporadas reproductivas 2000-2001 y 2001-2002. La población de gaviotas no reproductiva estuvo conformada por 50 (22,5%) gaviotas estables y 63 (28,4%) migratorias. Al igual que en la temporada 2001-2002, estas aves compartieron el nicho ecológico con skuas no reproductivos (Figura 9). En la Figura 19 se representa la población de gaviota cocinera durante las temporadas reproductivas 2000-2001, 2001-2002, y 2002-2003, en Bahía Esperanza.

**b)** La población total de skuas estuvo conformada por 113 aves: 24 (21,2%) adultos reproductivos, 9 (8%) pichones y 80 (70,8%) skuas no reproductivos agrupados en torno al chorrillo A (Figura 9). Se censaron 11 nidos activos en las mismas áreas de nidificación que en la temporada 2001-2002. En la Figura 20 se representa la población de skua durante las temporadas reproductivas 2000-2001, 2001-2002 y 2001-2003.

**c)** La población de paloma antártica estuvo conformada por 71 aves: 30 (42,2%) adultos reproductivos, 15 (21,1%) pichones y 26 (36,6%) palomas no reproductivas. Se censaron 10 nidos activos en las mismas zonas de nidificación que en las temporadas 2000-2001 y 2001-2002.

En la Figura 21 se representa la población de paloma antártica durante las temporadas

reproductivas 2000-2001, 2001-2002 y 2001-2003.

En la Figura 22 se representa la distribución poblacional de las aves voladoras durante las temporadas reproductivas 2000-2001, 2001-2002 y 2001-2003.

**d)** La población de pingüino papua estuvo conformada por 700 aves: 320 (45,7%) adultos reproductivos, 300 (42,8%) pichones y 80 (11,4%) pingüinos papua no reproductivos. En la costa Noroeste de Bahía Esperanza se censaron 190 nidos activos. En la Figura 23 se representa la población de pingüino papua durante las temporadas reproductivas 2000-2001, 2001-2002 y 2001-2003.

#### **4.2.2. Recolección de aves muertas en Bahía Esperanza**

##### **4.2.2.1. Recolección de las aves muertas en la temporada reproductiva 2000-2001**

Entre noviembre del año 2000 y febrero del año 2001, se colectaron y analizaron 82 aves muertas: 51 pingüinos Adelia (46 AR y 5 Pi), 23 skuas (AR), 6 gaviotas cocineras (4 Nr y 2 AR), un pingüino papua (AR) y una paloma antártica (AR).

De las 82 carcasas analizadas, 14 pingüinos Adelia y 6 skuas fueron hallados moribundos, capturados e identificados, en un radio de 300 m alrededor de los cuerpos de agua dulce 1 y 2 (Figura 24). Las aves moribundas fueron observadas por un período de tiempo que no superó las 24 y 48 h hasta su muerte.

Las carcasas fueron halladas en los siguientes sitios de Bahía Esperanza: a) colonia reproductiva de pingüino Adelia, b) alrededor del Lago Boeckella, c) Caleta Aguila, d) colonia reproductiva de pingüino papua, e) Península Esperanza, f) zona del Faro, g) alrededor del cuerpo de agua dulce 6, y h) alrededor de los cuerpos de agua dulce 1 y 2. En este último sitio se encontró el 82% de las aves muertas, 21 skuas, una gaviota cocinera y 45 pingüinos Adelia (Figura 7 y 16).

#### **4.2.2.2. Recolección de las aves muertas en la temporada reproductiva 2001-2002**

Entre noviembre del año 2001 y febrero del año 2002, se encontraron 10 aves muertas: 5 skuas (4 AR y 1 Pi), 3 gaviotas cocineras (AR) y 2 pingüinos Adelia (AR). Todas las carcasas fueron halladas en el centro de la colonia reproductiva de pingüinos Adelia (Figura 17). Las mismas fueron identificadas, acondicionadas a -20°C y remitidas a la FCV-UNLP.

#### **4.2.2.3. Recolección de las aves muertas en la temporada reproductiva 2002-2003**

Entre noviembre del año 2002 y febrero del año 2003, se colectaron y analizaron 13 aves muertas. Se hallaron 7 pingüinos Adelia (3 AR y 4 Pi) en el centro de la pingüinera (n:5) y en la costa Noreste (n:2); 2 skuas (AR) en la costa Noreste; 2 pingüinos papua (AR) en la zona de nidificación de pingüinos papua; una gaviota cocinera (Pi) en la zona del faro; y una paloma antártica (AR) en la Península Antártica (Figura 18).

### **4.3. DIAGNOSTICO PATOLOGICO**

#### **4.3.1. Diagnóstico patológico de las aves halladas muertas en la temporada reproductiva 2000-2001**

Entre noviembre del año 2000 y febrero del año 2001 se recolectaron 82 aves halladas muertas. La necropsia de estas aves se realizó en Bahía Esperanza.

En el período comprendido entre el 1 de noviembre del año 2000 y el 9 de enero del año 2001, se hallaron 9 aves muertas: 3 gaviotas cocineras (machos), 5 pingüinos Adelia (3 machos y 2 hembras) y una paloma antártica (ND).

En la carcasa de una gaviota cocinera se halló una masa aparentemente tumoral en el espacio interdigital de la pata izquierda. Las otras 2 carcasas de gaviotas cocineras y la carcasa de la paloma antártica presentaban evidentes cambios posmortem y por lo tanto no pudieron ser



analizadas. Un pingüino Adelia presentaba prolapso cloacal, otro una luxación femorotibiorrotuliana y en 2 ejemplares no se observaron lesiones. En el quinto pingüino Adelia hallado muerto se diagnosticó Dermatitis Gangrenosa, la carcasa presentaba pequeñas cicatrices de aproximadamente 2 cm de longitud en el parche incubatriz. Debajo de la piel afectada se observó una extensa área de edema y hemorragia que abarcaba toda la región pectoral y ambos miembros pelvianos. La musculatura presentaba color gris y entre los haces musculares se observó edema y gas. Se observó hepatomegalia y esplenomegalia. En el resto de los órganos no se hallaron lesiones macroscópicas.

En el período comprendido entre el 10 de enero y el 20 de febrero del año 2001, se hallaron 73 aves muertas. Se analizaron 23 skuas (16 hembras y 7 machos), 3 gaviotas cocineras (2 hembras y un macho), 46 pingüinos Adelia (22 hembras y 24 machos) y un pingüino papua (hembra).

Seis skuas y 14 pingüinos Adelia fueron hallados moribundos. Los skuas presentaban polidipsia, temblores, disnea, estertores y abundante secreción mucosa en las narinas y en la cavidad bucofaríngea. Además, presentaban mal estado general, inhabilidad para volar, incoordinación y falta de respuesta ante el acercamiento humano. La temperatura corporal superaba los 43°C. Los pingüinos Adelia presentaban signología nerviosa, temblores, incoordinación y opistótonos.

No se observaron ectoparásitos en ninguna carcasa. Dos gaviotas cocineras, 23 skuas y 45 pingüinos Adelia presentaron las conjuntivas hiperémicas.

En los skuas se observó gran cantidad de secreción mucosa, de consistencia viscosa, en la cavidad bucofaríngea y en la traquea. Las superficies de los órganos de la cavidad celómica se hallaron hiperémicas y hemorrágicas. Se observó poliserositis y un exudado fibrinoso que

recubría la cápsula hepática, los sacos peritoneales y los sacos aéreos. En el análisis histopatológico se observaron heterófilos, macrófagos y linfocitos asociados a las membranas serosas afectadas. El pericardio contenía abundante cantidad de fibrina y estaba fuertemente adherido al esternón y al corazón (Figura 25). El análisis histopatológico reveló hemorragias subepicárdicas, pericarditis y epicarditis fibrinosa, con linfocitos y heterófilos (Figura 26). En el miocardio se observaron hemorragias e infiltración de heterófilos en áreas de necrosis focal aguda. Los pulmones presentaban áreas neumónicas (Figura 27). En el análisis histopatológico se observó edema, congestión y hemorragia perivascular con presencia de heterófilos, macrófagos y linfocitos. El bazo presentaba esplenomegalia con petequias y equimosis, y en el hígado se observó hemorragia y congestión. El estómago de las aves se encontraba vacío. Las lesiones descritas fueron compatibles con un cuadro subagudo de Cólera Aviar.

Dos gaviotas cocineras presentaban las plumas de la cabeza en muy mal estado. Las lesiones observadas fueron exudado y edema en los espacios aéreos de la cabeza, las que se extendían desde los senos infraorbitarios hasta las regiones periorbital e intermandibular. Los músculos de la cara y del cráneo se encontraban hemorrágicos e hiperémicos (Figura 28). El estómago de estas aves estaba vacío. No se encontraron lesiones o áreas anormales en el hígado, bazo, corazón, ni en ninguna víscera de la cavidad celómica. Las lesiones observadas fueron compatibles con un cuadro crónico de Cólera Aviar. En la tercera gaviota hallada no se encontraron lesiones compatibles con Cólera Aviar, aunque se halló una masa aparentemente tumoral en el espacio interdigital de la pata derecha.

En ninguno de los 46 pingüinos Adelia analizados, se observaron lesiones en cavidad bucofaríngea, tráquea, pulmones, membranas serosas y pericardio.

El tracto digestivo de 45 pingüinos Adelia presentaba hiperemia generalizada y evidentes cambios vasculares (Figura 29). El estómago de cada una de las 45 aves contenía una cantidad regular de krill. Las paredes del intestino se encontraban hiperémicas y la superficie serosa presentaba hemorragias petequiales. Se observó hepatomegalia y esplenomegalia con petequias y equimosis (Figura 30). En todos los pingüinos muertos por Cólera Aviar se observaron áreas de necrosis de 1 a 2 mm de diámetro, distribuidas en ambos lóbulos; el examen microscópico del hígado reveló múltiples áreas de necrosis coagulativa e infiltración generalizada con predominio de heterófilos. Si bien se observó hiperemia en la duramadre (Figura 31), no se encontraron lesiones en el sistema nervioso. Las lesiones observadas fueron compatibles con un cuadro agudo de Cólera Aviar.

En una carcasa de pingüino no se observaron lesiones compatibles con Cólera Aviar. En dicho ejemplar se diagnosticó Dermatitis Gangrenosa.

Sobre un total de 82 aves halladas en el verano 2001, 70 (85,4%) murieron por Cólera Aviar: 45 pingüinos Adelia, 23 skuas y 2 gaviotas cocineras. En la Tabla 13 (a y b) se detalla la especie, la edad y el sexo de las aves muertas entre noviembre del año 2000 y febrero del año 2001, como así también la causa de la muerte de cada ejemplar y lugar en el que fue hallado.

#### **4.3.2. Diagnóstico patológico de las aves halladas muertas en la temporada reproductiva 2001-2002**

Entre noviembre del año 2001 y febrero del año 2002, se encontraron 10 aves muertas: 5 skuas (4 machos y una hembra), 3 gaviotas cocineras (2 machos y una hembra) y 2 pingüinos Adelia (un macho y una hembra). Todas las carcasas fueron halladas en el centro de la pingüinera.

En las aves halladas muertas durante este período no se observaron lesiones macroscópicas compatibles con Cólera Aviar, excepto en un skua que presentaba evidentes

cambios posmortem y que habría muerto durante la epizootia del verano 2000-2001. La carcasa de otro skua presentaba fractura expuesta de radio y cubito, posiblemente ocasionada por predadores. En el resto de las carcasas no se observaron lesiones.

En la Tabla 14 se detalla la especie, la edad y el sexo de las aves muertas entre noviembre del año 2001 y febrero del año 2002, como así también la causa de la muerte de cada ejemplar y lugar en el que fue hallado.

#### **4.3.3. Diagnóstico patológico de las aves halladas muertas en la temporada reproductiva 2002-2003**

Entre noviembre del año 2002 y febrero del año 2003, se hallaron 13 aves muertas: 7 pingüinos Adelia (3 machos y 4 de sexo no determinado), 2 skuas (un macho y uno de sexo no determinado), una gaviota cocinera (sexo no determinado), 2 pingüinos papua (un macho y una hembra) y una paloma antártica (macho).

En las aves halladas muertas durante este período no se observaron lesiones compatibles con Cólera Aviar. Una paloma antártica, 2 pingüinos Adelia y 2 pingüinos papua presentaban múltiples lesiones traumáticas.

Los pingüinos papua, además de los traumatismos, presentaban granulomas parasitarios en el intestino de 0,5 a 1,5 cm de diámetro. El intestino presentaba enteritis catarral, la mucosa se encontraba congestiva y las paredes estaban engrosadas. Los granulomas estaban tabicados y contenían numerosas larvas de *Cyclophyllideos*.

No fue posible analizar las carcasas de un skua y de una gaviota cocinera debido a que presentaban evidentes cambios posmortem. En el resto de las carcasas no se observaron lesiones.

En la Tabla 15 se detalla la especie, la edad y el sexo de las aves muertas entre noviembre del año 2002 y febrero del año 2003, como así también la causa de la muerte de cada ejemplar y lugar en el que fue hallado.

#### **4.4. DIAGNOSTICO MICROBIOLOGICO**

##### **4.4.1. Aislamiento de *P. multocida***

- **Muestras de aves halladas muertas y cuerpos de agua dulce**

Durante el brote de Cólera Aviar ocurrido entre los meses de enero y febrero del año 2001 se aislaron 54 cepas de *P. multocida*:

- a) 23 cepas fueron aisladas de 23 skuas que presentaban lesiones compatibles con un cuadro subagudo de Cólera Aviar, 18 cepas fueron aisladas de pulmón, 4 de cavidad bucofaríngea y una de hígado.
- b) 2 cepas fueron aisladas de la cavidad bucofaríngea de 2 gaviotas cocineras que presentaban lesiones compatibles con un cuadro crónico de Cólera Aviar.
- c) 28 cepas fueron aisladas de 28 pingüinos Adelia que presentaban lesiones compatibles con un cuadro agudo de Cólera Aviar, 27 cepas fueron aisladas de hígado y una de pulmón.
- d) una cepa fue aislada del cuerpo de agua dulce 1.

No se aisló *P. multocida* en las aves muertas durante los veranos 2001-2002 y 2002-2003.

Tampoco se aisló *P. multocida* a partir de muestras de agua dulce durante el verano 2002-2003.

- **Muestras de aves vivas sin manifestación de enfermedad**

No se aisló *P. multocida* en ninguna de las muestras de cavidad buco-faríngea obtenidas de skuas, pingüinos Adelia y palomas antárticas sin sintomatología de Cólera Aviar durante los veranos

2000-2001 y 2002-2003.

#### **4.4.2. Caracterización fenotípica de los aislamientos de *P. multocida***

La caracterización fenotípica de los 54 aislamientos de *P. multocida* provenientes de Bahía Esperanza se basó en los siguientes resultados:

**a)** Micrométodo comercial API20E: *P. multocida* biocódigo 0140524.

**b)** Características tintoriales, morfológicas y bioquímicas: los 54 aislamientos presentaron colonias pequeñas de 2-3 mm de diámetro, opacas y adherentes al medio. Al microscopio óptico presentaron morfología de bacilos cortos gram negativos con coloración bipolar. El resultado de las pruebas bioquímicas fue el siguiente: oxidasa y catalasa positiva, indol positivo y nitrato positivo. Ausencia de crecimiento en agar MacConkey y en caldo para la detección de ornitina decarboxilasa. Hemólisis y urea negativas. Fermentación de glucosa, manitol, arabinosa, sorbitol, dulcitol, manosa y sacarosa. Lactosa, trehalosa, maltosa y xilosa negativas. Los 54 aislamientos provenientes de Bahía Esperanza fueron identificados como *P. m. gallicida* (Tabla 16). La clasificación taxonómica de las mismas se corroboró mediante la secuenciación del gen 16S ARNr.

**c)** Tipo capsular: todos los aislamientos provenientes de Bahía Esperanza presentaron tipo capsular A, ya que se obtuvo un fragmento de 1044 pb correspondiente a un segmento del gen *hya* cuyo producto está involucrado en la síntesis capsular.

**d)** Serotipo somático: todos los aislamientos provenientes de Bahía Esperanza presentaron serotipo somático 1 (Tabla 16).

#### **4.4.3. Susceptibilidad de las cepas de *P. multocida* a diferentes antimicrobianos**

Las 54 cepas de *P. multocida* subespecie *gallicida*, tipo capsular A y serotipo somático 1, aisladas en Bahía Esperanza, fueron sensibles a ampicilina ( $\leq 0.5$   $\mu\text{g/ml}$ ), cefalotina ( $\leq 0.5$

μg/ml), ceftiofur sódico ( $\leq 0.25$  μg/ml), enrofloxacin ( $\leq 0.06$  μg/ml), estreptomycin (entre 4 y 16 μg/ml), florfenicol ( $\leq 0.5$  μg/ml), gentamicin ( $\leq 1$  μg/ml), tetracycline ( $\leq 0.5$  μg/ml), y tiamulina (8 μg/ml). Los resultados obtenidos con los macrólidos avilosis (128 μg/ml) y tilosina (entre 16 y 32 μg/ml) no pudieron ser interpretados ya que no existen puntos de corte para dichos antibióticos.

En la Tabla 17 (a y b) se detallan los resultados obtenidos al determinar la concentración inhibitoria mínima de los antimicrobianos probados con cada una de las cepas aisladas en la Antártida.

#### **4.4.4. Subtipificación molecular de las cepas de *P. multocida* aisladas en Bahía Esperanza**

Las 54 cepas de *P. m. gallicida* tipo A:1 aisladas durante el brote de Cólera Aviar del año 2001 en Bahía Esperanza fueron indistinguibles por ERIC-PCR y correspondieron a un único patrón, el cual presentó 11 bandas bien definidas, entre 0,2 y 1,2 kb (Figura 32).

Las mismas 54 cepas fueron idénticas por PFGE. Al ser analizadas por *ApaI*-PFGE presentaron un patrón indistinguible de 14 bandas bien definidas, entre 40 y 400 kb (Figura 33). Estos resultados fueron confirmados por *SmaI*-PFGE, ya que mediante esta técnica se observó un patrón único con 18 bandas bien definidas, entre 20 y 200 kb (Figura 34).

#### **4.4.5. Cepas de *P. multocida* de diferente origen**

Las 3 cepas de *P. multocida* aisladas en la Antártida durante el año 2000, fueron identificadas como *P. m. gallicida* tipo A:1 (Tabla 16) y fueron sensibles a todos los antimicrobianos utilizados (Tabla 17a).

Las cepas de referencia correspondientes a los serotipos 1 a 16, fueron caracterizadas como *P. m. multocida* (n:12), *P. m. septica* (n:2) y *P. m. gallicida* (n:2), cuyos grupos capsulares

fueron A (n:11), D (n:1), B (n:1) y NT (n:3) (Tabla 18). Las cepas S11, S15 y S10 presentaron resistencia a tiamulina (Tabla 19).

Las cepas aisladas de gallinas reproductoras fueron caracterizadas como *P. m. multocida* (n:7), *P. m. gallicida* (n:3) y *P. m. septica* (n:1) y presentaron los siguientes tipos, A:1 (n:4), A:3 (n:3), A:3xw4 (n:1), A:12 (n:1), NT:2x5 (n:1) y A:NT (n:1) (Tabla 20). La cepa originaria de Uruguay presentó resistencia a enrofloxacin (Tabla 21).

Las cepas aisladas de cerdos fueron caracterizadas como *P. m. multocida* (n:10) y tipificadas como A:3 (n:4), D:3x5 (n:4), D:3 (n:1) y A:4 (n:1) (Tabla 22). Nueve cepas fueron resistentes a tiamulina y 2 a estreptomicina (Tabla 21).

Sobre un total de 41 cepas de *P. m. multocida* analizadas, se detectaron 24 patrones ERIC-PCR, los que fueron identificados desde la letra A hasta la letra X. Los patrones obtenidos por ERIC-PCR presentaron entre 10 y 14 bandas en un rango comprendido entre 0,2 y 1,2 kb y fueron agrupados en 5 grupos clonales o clusters (i-v).

Las cepas aisladas en la Antártida durante el año 2000 presentaron el mismo perfil molecular por ERIC-PCR que las cepas aisladas en Bahía Esperanza durante la temporada reproductiva 2000-2001.

En el cluster *i* agruparon 11 patrones (A-K) correspondientes a 27 cepas. Los patrones A, B, C, y D correspondieron a las cepas S3, S4, C8, y S2, respectivamente, y tuvieron un 93,7% de similitud. El patrón E representó a 2 cepas aisladas de gallinas reproductoras (004, 010) y el patrón F a una cepa (005). Entre los patrones E y F hubo un 95,6% de similitud. El patrón G correspondió a 12 cepas, 9 de cerdos (C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C9, C10), 2 de gallinas reproductoras (002, 003) y una cepa de referencia (S12). Entre los patrones E y F, y el patrón G se observó un 93,5% de similitud. Los patrones H e I presentaron un 95,2% de similitud y



representaron a las cepas de referencia S10 y S11. Los patrones J y K representaron a 6 cepas de *P. m. gallicida* tipo A. El patrón J correspondió a las cepas antárticas y presentó una similitud del 95,5% con el patrón K (S1, S14, 011). Los patrones J y K se diferenciaron en una banda de 0,3 kb.

En el cluster *ii* agruparon 5 patrones correspondientes a 6 cepas de *P. multocida*, con un 89,6% de similitud. Los patrones L y M tuvieron una similitud del 96% y correspondieron a 2 cepas de gallinas reproductoras (B-82 y 005). Las cepas de referencia S6 y S7 fueron indistinguibles por ERIC-PCR y presentaron el mismo patrón de restricción N, el cual tuvo una similitud del 96,8% con el patrón O, correspondiente a la cepa ATCC 51689. En el mismo cluster agrupó el patrón P, correspondiente a la cepa de referencia S15, el cual presentó una similitud del 89,6% con el resto de los patrones de este cluster.

En el cluster *iii* agruparon 3 cepas de *P. m. septica* con un 87,5% de similitud. Los patrones Q, R y S, correspondientes a las cepas S13, S8 y 013, respectivamente.

En el cluster *iv*, con una similitud del 88,3%, agruparon los patrones T, U y V, correspondientes a las cepas 001, S9 y S16, respectivamente. En el cluster *v* agruparon 2 cepas de *P. m. multocida* con una similitud del 90%. En la Figura 35 se presenta el dendrograma confeccionado a partir de los resultados obtenidos por ERIC-PCR.

Sobre un total de 40 cepas de *P. multocida* analizadas, se detectaron 32 patrones *ApaI*-PFGE, los que fueron identificados del 1 al 32. La cepa de referencia *P. m. gallicida* ATCC 51689 no se incluyó en el análisis por *ApaI*-PFGE porque el ADN se degradó en 3 ocasiones, inclusive al adicionar tiourea al buffer de corrida.

Los patrones de restricción obtenidos por *ApaI*-PFGE presentaron entre 7 y 15 bandas bien definidas, de 34 a 450 kb. Al analizarlos fue posible observar 9 clusters, identificados del I

al IX. A pesar de la diversidad genética observada, los patrones de restricción 9, 14, 16 y 17, se detectaron con mayor frecuencia, agrupando 3, 2, 3 y 4 cepas, respectivamente.

Las 2 cepas aisladas en Bahía Esperanza en febrero del año 2000 y la cepa aislada de un petrel gigante del sur en Península Potter presentaron el mismo patrón *ApaI*- y *SmaI*-PFGE que las cepas aisladas durante la temporada 2000-2001 en Bahía Esperanza.

En el cluster V agruparon los patrones *ApaI*-PFGE 14, 15 y 16 correspondientes a *P. m. gallicida* tipo A. El patrón 16, obtenido con las cepas antárticas, presentó una similitud del 82,3% con los patrones 14 y 15 obtenidos con las cepas de referencia S1 y S14, respectivamente. La cepa 011 aislada de una gallina reproductora en el año 1983 en la localidad de Zárate, Provincia de Buenos Aires, fue indistinguible por *ApaI*-PFGE de la cepa de referencia S1. El patrón 16 obtenido con las cepas antárticas se diferenció del patrón 14 en 4 bandas de 34, 36, 150 y 330 kb y del patrón 15 en 4 bandas de 34, 36, 150 y 210 kb.

Las 16 cepas de referencia presentaron 16 patrones polimórficos por *ApaI*-PFGE. Los patrones 6 y 7 agruparon en el cluster II con un 90% de similitud y correspondieron a las cepas de *P. m. multocida* S6 y S7, respectivamente. Los patrones 31 y 32 agruparon en el cluster IX con un 87,5% de similitud y correspondieron a las cepas de *P. m. septica* S8 y S13, respectivamente.

Las cepas aisladas de gallinas reproductoras presentaron una gran diversidad genética y solamente agruparon en clusters los patrones 3, 5, 14, 22 y 23. Los patrones 3 (002) y 5 (003) presentaron un 81,8% de similitud y agruparon en el cluster I, junto con el patrón 4 (S3). Los 3 patrones correspondieron a cepas de *P. m. multocida* A:3. El patrón 3 presentó una similitud del 88,9% con el patrón 4, del cual se diferenció por 3 bandas de 200, 250 y 450 kb. El cluster VII estuvo conformado por los patrones 22 y 23, correspondientes a 2 cepas de *P. m. multocida* tipo A aisladas de gallinas reproductoras (004, 006), las cuales tuvieron un 81,5% de similitud.

Las cepas aisladas de cerdos presentaron menor diversidad genética por *ApaI*-PFGE que las cepas aisladas de gallinas reproductoras y agruparon en 3 clusters: III, IV y VI. En el cluster III agruparon los patrones 9, 10 y 11 con un 81,8% de similitud. El patrón 9 estuvo representado por 3 cepas clonales de *P. m. multocida* tipo D:3x5 (C1, C5, C9), el patrón 10 por una cepa de *P. m. multocida* tipo D:5 (C7) y el patrón 11 correspondió a la cepa S11 de *P. m. multocida* tipo D:11 originaria de cerdo. Este cluster tuvo un 79,6% de similitud con el cluster IV, en el cual agruparon los patrones 12 y 13, correspondientes a 2 cepas de *P. m. multocida* tipo D (C4 y S15). En el cluster VI y con 85,2% de similitud, agruparon 3 patrones correspondientes a 6 cepas de *P. m. multocida* tipo A. El patrón de restricción 17 estuvo representado por 4 cepas clonales de *P. m. multocida* A:3 (C2, C3, C6, C10), las cuales presentaron 92,5% y 85,2% de similitud con los patrones 18 (S12) y 19 (S10), respectivamente.

Los patrones 1, 2, 8, 20, 21, 26, 27, 28, 29 y 30, correspondieron a las cepas de *P. multocida* 009, 010, 005, S5, S2, 013, C8, 001 y B-82, respectivamente, y tuvieron menos del 80% de similitud por *ApaI*-PFGE.

En la Figura 36 se presenta el dendrograma confeccionado a partir de los resultados obtenidos por *ApaI*-PFGE.

A partir del número de patrones obtenidos con las 41 cepas de *P. multocida* se determinó el poder discriminatorio de las 2 técnicas de subtipificación molecular utilizadas y se demostró que el índice de discriminación obtenido con *ApaI*-PFGE ( $D=0,98$ ) fue superior al obtenido con ERIC-PCR ( $D=0,90$ ).

## **4.5. DIAGNOSTICO MICROBIOLOGICO DIFERENCIAL DE COLERA AVIAR**

### **4.5.1. Análisis Bacteriológico**

No se aisló *Avibacterium paragallinarum* a partir de muestras de cavidad buco-faríngea, hígado, pulmón, bazo y corazón de las aves halladas muertas.

No se aisló *Mycoplasma* spp., ni se detectó *Chlamydophila psittaci* a partir de las muestras de traquea y pulmón de los skuas que presentaron lesiones en el tracto respiratorio.

#### **4.5.1.2. Identificación de *Escherichia coli***

En enero y febrero del año 2001 se aislaron e identificaron 25 cepas de *E. coli* de las aves muertas por Cólera Aviar, 23 de ellas se aislaron de skuas, 13 de cavidad buco-faríngea, 3 de hígado, 4 de pulmón y 3 de bazo; 2 cepas de *E. coli* se aislaron de pingüino Adelia, una de pulmón y otra de hígado. Dos cepas de *E. coli* aisladas de cavidad buco-faríngea de skuas presentaron factores de virulencia y fueron caracterizadas como *E. coli* enteropatógeno (EPEC). En el resto de las cepas no se detectaron los factores de virulencia buscados.

#### **4.5.1.3. Identificación de bacterias productoras de hidrógeno sulfurado**

Se aisló 1 cepa de *Edwardsiella tarda* a partir del contenido intestinal de 1 skua muerto por Cólera Aviar entre enero y febrero del año 2001. En ninguna de las muestras analizadas se aisló *Salmonella* spp.

#### **4.5.2. Análisis micológico**

No se observaron estructuras fúngicas al realizar la observación directa de improntas de los órganos sospechosos al microscopio óptico. En ninguna de las muestras analizadas a partir de aves con lesiones en el tracto respiratorio se aisló *Aspergillus* spp. Sin embargo, se aisló *Thelebolus microsporus* de la traquea de un skua.

#### **4.5.3. Análisis virológico**

Las muestras de pulmón e hisopados cloacales de las aves halladas muertas en el brote de Cólera Aviar del verano 2000-2001, fueron negativas para Bronquitis Infecciosa, Laringotraqueítis,

Influenza y Enfermedad de Newcastle. No se observó efecto citopático en ninguno de los pasajes realizados en cultivos celulares, ni se observaron lesiones en los huevos embrionados de gallina. No se observó hemoaglutinación al analizar el líquido alantoideo cosechado de cada pasaje en huevo embrionado, ni al analizar el sobrenadante de cada pasaje en cultivo de células.

Los resultados obtenidos mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta para la detección del virus Influenza tipo A fueron negativos.

#### **4.6. PROCESAMIENTO DE LA INFORMACION**

Durante las temporadas reproductivas 2000-2001, 2001-2002 y 2002-2003, la tasa de mortalidad general en las poblaciones de aves voladoras de Bahía Esperanza tuvo una media global de 4,9%. La población de skuas fue la más afectada, con una mortalidad promedio del 12,3%. La mortalidad específica más alta en esta población de aves se observó durante la temporada reproductiva 2000-2001. En la población de gaviotas cocineras la mortalidad promedio fue de 1,7% y la mortalidad específica más alta se observó durante la temporada 2000-2001. La población de paloma antártica presentó la tasa de mortalidad promedio más baja con una media de 0,8% y la mortalidad específica más alta se observó durante la temporada reproductiva 2002-2003 (Tabla 23).

Entre las aves nadadoras, la población de pingüinos papua presentó una mortalidad promedio de 0,14%. En la temporada 2000-2001 la mortalidad fue de 0,14%, en la temporada 2001-2002 no se encontraron pingüinos papua muertos y durante la temporada reproductiva 2002-2003 la mortalidad fue de 0,3%.

La mortalidad promedio en pingüinos Adelia fue de 5,3 cada 100.000 aves y la mayor mortalidad específica se observó durante la temporada 2000-2001 ( $13,7^{0}/_{0000}$ ). En las temporadas 2001-2002 y 2002-2003 la mortalidad específica fue de  $0,5^{0}/_{0000}$  y  $1,8^{0}/_{0000}$ , respectivamente.

Para analizar la mortalidad de aves en cada una de las 3 temporadas reproductivas estudiadas, se clasificaron los datos en una temporada temprana y en una temporada tardía, considerando como límite entre ambas el día 31 de diciembre (Tabla 24).

Al analizar la mortalidad de aves voladoras, se observó que en la temporada tardía 2000-2001 la mortalidad promedio fue mayor (16%) y que los skuas fueron las aves más afectadas (30,6%). La elevada mortalidad de skuas observada durante la temporada tardía 2000-2001 y la baja mortalidad de estas aves durante las temporadas 2001-2002 (1,8%) y 2002-2003 (0%) comprueba que la mortalidad de skuas durante la temporada tardía 2000-2001 fue debido a una causa determinada. Mediante el diagnóstico microbiológico se determinó que esta causa fue Cólera Aviar. No se observaron muertes de paloma antártica durante las 3 temporadas tardías analizadas.

La mortalidad de pingüinos Adelia fue mayor durante la temporada tardía 2000-2001 ( $12,1^{0}/_{0000}$ ) que durante la temporada temprana ( $1,3^{0}/_{0000}$ ), coincidiendo con la presentación de Cólera Aviar. Sin embargo, en la población de pingüinos Adelia el impacto de esta enfermedad no fue tan importante como en la población de skuas. La mortalidad promedio de pingüinos Adelia en las temporadas tempranas y tardías 2001-2002 y 2002-2003 fue de  $0,8^{0}/_{0000}$  y  $0,2^{0}/_{0000}$ , respectivamente. No se observaron muertes de pingüinos papua durante las 3 temporadas tempranas analizadas, ni en la temporada tardía 2001-2002. En las temporadas tardías 2000-2001 y 2002-2003 la mortalidad de pingüinos papua fue de 0,2% y 0,4%, respectivamente. En la

Figura 37 se presentan las aves muertas en las temporadas reproductivas 2000-2001, 2001-2002 y 2002-2003.

Los datos obtenidos entre noviembre del año 2000 y febrero del año 2001 fueron categorizados según la causa de muerte (Cólera Aviar y otras causas) y la temporada reproductiva (temprana y tardía). Entre los grupos analizados se observó que la mortalidad de aves en la temporada tardía fue superior a la observada en la temporada temprana. En la Figura 38 se presentan las aves muertas por Cólera Aviar y debido a otras causas en la temporada reproductiva 2000-2001.

El brote de Cólera Aviar en el año 2001 presentó una curva temporal epizoótica prolongada a corto plazo, que se inició el día 10 de enero y finalizó el día 20 de febrero. La mayor cantidad de aves muertas se observó el día 28 de enero (Figura 39). Sin embargo, se observaron diferencias al comparar las curvas epizoóticas de cada especie afectada (Figura 40).

Entre enero y febrero del año 2001 solamente murieron 2 gaviotas cocineras por Cólera Aviar. El primer ejemplar fue hallado el día 10 de enero y marcó el inicio del brote de Cólera Aviar y el segundo fue hallado el día 31 de enero.

Al analizar el período en el que se hallaron muertos los skuas, se observó una curva temporal epizoótica de tipo propagativo, que comenzó el día 17 de enero y finalizó el día 20 de febrero. En los pingüinos la situación fue diferente, la mortandad comenzó el 22 de enero, la mayor cantidad de carcasas se registró el día 28 de enero y el 6 de febrero se encontró el último pingüino muerto. Esta distribución se asemeja a una curva temporal epizoótica de tipo puntual.

Al observar la suavización de tendencia discriminada por especie afectada, se pudo determinar que las curvas coincidieron con el tiempo de evolución en las distintas especies, ya

que en las gaviotas cocineras el cuadro fue crónico, en skuas subagudo y en pingüinos agudo (Figura 41).

La población de skuas fue la más afectada por Cólera Aviar y presentó una tasa de mortalidad de 30,6%. La poblaciones de gaviota cocinera y pingüino Adelia presentaron una tasa de mortalidad por Cólera Aviar de 0,9% y 0,01%, respectivamente.

Para completar la descripción del brote de Cólera Aviar en Bahía Esperanza, se clasificaron los datos recolectados de las aves muertas según el sexo, la edad, la fecha de arribo y el sitio de asentamiento.

Entre los skuas muertos por Cólera Aviar se observaron 16 hembras y 7 machos. Sin embargo, las diferencias estadísticas no fueron significativas ( $X^2 = 3,52$   $G = 1$   $p > 0,05$ ). Entre la población de pingüinos Adelia muertos por esta enfermedad se observaron 21 hembras y 24 machos, y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $X^2 = 0,2$   $G = 1$   $p > 0,05$ ).

Al clasificar los ejemplares muertos según la edad se observó que todas las aves voladoras afectadas por Cólera Aviar fueron adultos no reproductivos (Nr). En la población de pingüinos Adelia la mortalidad fue mayor en adultos reproductivos (n:40) que en pichones (n:5), observándose diferencias estadísticamente significativas ( $X^2 = 27,2$   $G = 1$   $p < 0,05$ ).

Las poblaciones de aves fueron clasificadas en estables y esporádicas, según la fecha en que arribaron a Bahía Esperanza, considerando como límite entre ambas el día 31 de diciembre. Entre las poblaciones de aves estables se incluyeron los pingüinos Adelia (124.000 parejas), los skuas (n:75) y la población de gaviotas cocineras que arribó a Bahía Esperanza antes del 31 de diciembre del año 2000 (n:106). Se consideró como población de aves esporádicas a las gaviotas cocineras no reproductivas que arribaron a Bahía Esperanza a partir del 1 de enero del año 2001



(n:107). La población de aves estables fue la más afectada por la enfermedad; sobre un total de 70 aves muertas por *P. multocida*, 68 fueron estables (97%) y solo 2 fueron esporádicas.

Las poblaciones de aves voladoras fueron clasificadas según su exposición a los cuerpos de agua dulce 1 y 2, y se observó que el 96% de las aves muertas por Cólera Aviar fueron halladas en los mencionados cuerpos de agua.

En el presente estudio se propusieron diferentes variables climáticas como posibles factores conducentes a una epizootia de Cólera Aviar en Bahía Esperanza. Se utilizó el test de correlación de Spearman para poner a prueba la existencia de correlación entre las variables climáticas (temperatura, lluvia, nieve y viento) y el número de aves muertas entre enero y febrero de los años 2001, 2002 y 2003. No se encontró una asociación estadísticamente significativa ( $p > 0,05$ ) (Tabla 25). Se concluye que las variables climáticas analizadas no tuvieron relación con la presentación de Cólera Aviar en Bahía Esperanza durante el verano 2001. Se compararon los valores de las variables climáticas obtenidos en los meses de enero y febrero de los años 2001, 2002 y 2003 mediante el test de Kruskal Wallis y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ).

## **5. DISCUSION**

La posibilidad de introducción de enfermedades al Continente Antártico fue un tema reconocido desde la firma del Tratado Antártico ([www.opanal/NWFZ/Antartico/antartico\\_sp.pdf](http://www.opanal/NWFZ/Antartico/antartico_sp.pdf)) y fue considerado en el “1° Encuentro del Grupo de Trabajo de Biología del Comité Científico para la Investigación Antártica (SCAR)” en 1962 (Kerry et al., 1999). Si bien en el Protocolo de Madrid ([www.conama.cl/portal/1255/fo-article-26075.pdf](http://www.conama.cl/portal/1255/fo-article-26075.pdf)) se sugirieron algunas medidas preventivas, el problema no recibió la debida atención. Hasta el presente no se realizó ningún trabajo que aporte la información necesaria para diseñar un modelo epidemiológico, sin el cual no es posible proponer e implementar procedimientos prácticos para evitar la introducción de enfermedades al Continente Antártico.

La mayoría de los trabajos sobre mortalidades de aves antárticas no fueron más que simples descripciones de sucesos reconocidos en forma casual, sin un análisis exhaustivo para determinar el origen y la transmisión del agente etiológico. Incluyendo los resultados obtenidos en el presente trabajo, solo se describieron 12 mortalidades de aves en la Antártida e Islas Subantárticas, de las cuales 5 se produjeron en Bahía Esperanza. Es interesante destacar que entre estos 12 episodios, 5 fueron causados por Cólera Aviar y en 6 no se determinó la causa. El primer caso de Cólera Aviar en la Antártida fue descrito en skuas de la Isla Litchfield, Península Antártica (Parmelee et al., 1979). En el segundo episodio se vinculó la muerte de pingüinos rockhopper con *P. multocida* tipo A:1 en la Isla Campbell, Subantártida (de Lisle et al., 1990). Durante el año 2000 se registró un brote de Cólera Aviar en Bahía Esperanza y se halló un petrel gigante del sur muerto por esta enfermedad en la Isla 25 de Mayo, Shetland del Sur (Leotta et al.,

2003). El último brote de Cólera Aviar que afectó a las aves que nidifican en Bahía Esperanza se describió detalladamente en el presente trabajo.

En base a los resultados expuestos se sugiere que Cólera Aviar es la enfermedad infecciosa que mayor impacto provocó en las poblaciones de aves antárticas. Debido a que en la Antártida nunca se realizó el estudio sistemático de una enfermedad infecciosa que afecte a las aves, fue necesario considerar la experiencia adquirida en distintos lugares del mundo para el diseño de un modelo epizootiológico de Cólera Aviar.

Según Botzler (1991), el problema más importante que condiciona el desarrollo de un modelo viable para el estudio de Cólera Aviar en aves silvestres no es la ausencia de información sino la carencia de veracidad que presenta esta información. Wobeser (1992) reforzó este concepto y sugirió que existen varios factores que pueden contribuir a la ocurrencia de una epizootia de Cólera Aviar. Además, consideró que en lugar de un simple modelo para explicar la ocurrencia de la enfermedad se puede proponer una gran variedad de modelos que involucren varias combinaciones de factores.

En 1976 Evans propuso 10 postulados para estudios epidemiológicos y destacó que la asociación entre un factor causal hipotético y la enfermedad debe ser estadísticamente significativa, como así también, que la reducción lógica de comprobación requiere que el mecanismo de inducción de una enfermedad por parte de una causa, debe ser explicado mediante la descripción de la cadena de sucesos, desde la causa al efecto, inclusive a nivel molecular (Thrusfield, 1990).

Sin embargo, hasta el presente no se realizó ningún trabajo epizootiológico para el estudio de Cólera Aviar en poblaciones de aves silvestres que demuestre la cadena de sucesos durante un brote de esta enfermedad. En los primeros estudios sobre brotes de Cólera Aviar en aves

silvestres se describió con detalle el período y la duración de los brotes, como así también las áreas enzoóticas, las especies afectadas y el impacto de la enfermedad en las poblaciones estudiadas (Botzler, 1991). Sin embargo, no se determinó el origen de la enfermedad debido a que no se aisló *P. multocida* de aves sanas ni del ambiente. Inclusive son muy pocos los trabajos en los que se analizaron los aislamientos obtenidos de las aves afectadas mediante técnicas de epidemiología molecular. En Canadá y Dinamarca se intentó determinar el origen, el reservorio y la transmisión de *P. multocida* en algunas poblaciones de aves silvestres y domésticas (Samuel et al., 1997; 1999; Pedersen et al., 2003). Se demostró el período y la duración de los brotes, las áreas enzoóticas, las especies afectadas y el impacto de la enfermedad, pero en ninguno de los trabajos se pudo demostrar el origen, ni el reservorio de *P. multocida*.

Durante los veranos 2000 y 2001 en Bahía Esperanza se diagnosticó Cólera Aviar como la causa primaria de la muerte de las aves. El aislamiento de *P. m. gallicida* tipo A:1 de las carcasas reforzó el diagnóstico patológico y el hecho de que todas las cepas hayan presentado el mismo perfil molecular por 2 técnicas de subtipificación (ERIC-PCR, y PFGE con 2 enzimas de restricción) permitió confirmar que los brotes de Cólera Aviar estudiados tuvieron un origen común. Además, se obtuvieron resultados que permiten sugerir que el origen de la enfermedad fueron las gaviotas cocineras no reproductivas y se demostró que una charca de agua dulce fue la fuente de infección de la enfermedad.

La exposición de un ave susceptible a una fuente de infección es el punto de partida para la relación entre el huésped y el hospedador. No se produce un brote de Cólera Aviar sin la previa exposición de un ave susceptible a *P. multocida*. Sin embargo, la probabilidad de exposición depende de la cantidad de bacterias y de la cantidad de aves susceptibles. La probabilidad de infección esta relacionada con la puerta de entrada, la duración de la exposición y la virulencia

del microorganismo. Se considera que Cólera Aviar es una enfermedad con elevada tasa de mortalidad, aunque en aves silvestres se desconoce la proporción de ejemplares enfermos que se recuperan. Por lo tanto, la probabilidad de exposición, enfermedad, muerte o recuperación de un ave silvestre infectada por *P. multocida*, es el resultado de la interacción de varios factores, como por ejemplo la resistencia del agente etiológico al medio ambiente y la susceptibilidad de las aves afectadas (Wobeser, 1992).

Para simplificar el análisis del estudio epizootiológico de Cólera Aviar en Bahía Esperanza se adoptó el modelo de la tríada epidemiológica. Este modelo involucra el análisis de las características referentes al hospedador, al agente y al medio ambiente, como así también, la relación entre ellos. Además, se considera que esta relación determina la aparición de la enfermedad en el tiempo y el espacio.

### **5.1. AMBIENTE**

Se considera territorio nosogénico a un área que presenta las condiciones poblacionales, ecológicas y ambientales adecuadas para mantener una enfermedad y nosoárea al territorio en el que se presenta una enfermedad en particular (Thrusfield, 1990). Por lo tanto y teniendo en cuenta los resultados del presente estudio se considera que Bahía Esperanza es una nosoárea en la cual se presentó Cólera Aviar durante 2 temporadas reproductivas.

Cólera Aviar es una enfermedad cuya presentación fue descripta en aves silvestres de todos los Continentes (Botzler, 1991), inclusive en la Antártida (Leotta et al., 2003). La mayoría de las epizootias estuvieron delimitadas geográficamente (Price y Brand, 1984; Samuel et al., 1999; Pedersen et al., 2003) y asociadas con ambientes acuáticos, como pantanos, áreas de tierras bajas y ecosistemas marinos (Hazlewood et al., 1978; de Lisle et al., 1990; Samuel et al., 1997).

Las epizootias de esta enfermedad fueron descritas en épocas del año definidas, como verano, invierno y primavera, aunque no significa que la distribución de los casos sea estacional, ya que no existen estudios sistemáticos de las mortalidades de aves durante sus rutas migratorias.

Las primeras epizootias de Cólera Aviar descritas en Norteamérica ocurrieron en invierno (Rosen, 1971; Samuel et al., 1999), aunque en diferentes áreas de nidificación la mayor mortalidad de aves se observó durante el verano (Gershman et al., 1964; Reed y Cousineau, 1967; Korschgen et al., 1978). Varias especies de aves acuáticas que nidifican en Africa y Sudamérica también murieron por Cólera Aviar durante los meses de verano (Suarez e Ilazabal, 1941; Hudson, 1959). Sin embargo en Nebraska la mortalidad de aves silvestres causada por esta enfermedad comenzó en primavera (Zinkl et al., 1977; Windingstad et al., 1988). En Bahía Esperanza los brotes de Cólera Aviar sucedieron en verano, coincidiendo con la temporada reproductiva de las aves, aunque no se determinó si estas aves padecieron la enfermedad en sus rutas migratorias.

### **5.1.1. Agua**

Cuando una epizootia de Cólera Aviar comienza se produce una gran contaminación del medio ambiente, especialmente de los cuerpos de agua dulce, permitiendo la transmisión de *P. multocida* entre las aves. Para comprender mejor la importancia de esta enfermedad en áreas epizooticas, varios autores investigaron la calidad del agua y la sobrevivencia de la bacteria en aguas enzoóticas. Windingstad et al. (1988) comprobaron que la concentración de calcio, magnesio, cloro, sulfato y sodio fueron diferentes entre 2 áreas geográficas de Nebraska, una considerada enzoótica y otra no. Botzler (1991) para explicar la ausencia de Cólera Aviar en Centerville a partir de 1979, sugirió que la calidad del agua en la zona se modificó naturalmente.

En estudios experimentales se demostró que *P. multocida* puede sobrevivir durante largos períodos en agua y sedimento (Price y Brand, 1984; Backstrand y Botzler, 1986). Bredy y Botzler (1989) demostraron que *P. multocida* puede sobrevivir en agua durante un año bajo condiciones específicas, para ello evaluaron 6 características físico-químicas del agua y comprobaron que la temperatura a 18-20°C, la adición de proteínas, y la adición de 0,5% de cloruro de sodio, favorecieron la sobrevivencia de la bacteria. En contraste, la variación del pH, el contenido de arcilla y el nivel de sacarosa no modificaron la sobrevivencia de *P. multocida*.

Asimismo se realizaron diferentes estudios microbiológicos con muestras de agua colectada durante brotes de Cólera Aviar. En Dinamarca, se intentó aislar *P. multocida* de agua salada y de sedimento luego de un brote en 1996, y durante un brote en el año 2001, sin embargo los resultados fueron negativos (Pedersen et al., 2003). En Norteamérica, Rosen (1969) logró aislar cepas de *P. multocida* de los cuerpos de agua dulce en los que murieron 100 gansos de nieve; y Backstrand y Botzler (1986) aislaron *P. multocida* de muestras de agua en sitios enzoóticos de California. Titche (1979) demostró que una cepa de *P. multocida* conservó la viabilidad en agua salina durante 6 días y en aguas pantanosas adyacentes a la carcasa de un pato muerto por Cólera Aviar durante 30 días. Titche (1979) concluyó que la sobrevivencia de la bacteria es mayor en agua contaminada con carcasas de aves muertas. Sin embargo, no se conoce el tiempo que puede sobrevivir *P. multocida* en el agua de un sitio enzoótico en condiciones naturales.

Si bien se estudiaron aislamientos de *P. multocida* provenientes de muestras ambientales colectadas durante varios brotes de Cólera Aviar en Norteamérica (Rosen, 1969; Backstrand y Botzler, 1986; Botzler, 1991), hasta el presente no se realizaron estudios epidemiológicos que incluyan el análisis molecular de estas cepas (Samuel et al., 1999).

La vigilancia epizootiológica de Cólera Aviar realizada en Bahía Esperanza durante 3 veranos consecutivos, en la cual se incluyó el análisis de los cuerpos de agua dulce, es la primera realizada en la Antártida. Inclusive, el presente trabajo es el primero en el que se aisló, caracterizó y subtipificó una cepa de *P. multocida* aislada de agua ambiental durante un brote de Cólera Aviar. Mediante la utilización de técnicas de subtipificación molecular se demostró que las cepas aisladas de las aves muertas por Cólera Aviar y la cepa aislada de una charca fueron indistinguibles y pertenecieron a un mismo clon de *P. multocida*. Además, se demostró que el agua de los charcos en torno a los que se asentaron las aves durante el verano 2000-2001 presentaron el pH y la salinidad óptima para permitir la sobrevivencia de *P. multocida* (Bredy y Botzler, 1989). Durante la temporada 2000-2001 no se pudo evaluar la sobrevivencia de la bacteria en el agua al finalizar el brote de Cólera Aviar. Sin embargo, en las temporadas posteriores no se aisló *P. multocida* de los cuerpos de agua dulce, ni se observaron aves muertas por Cólera Aviar.

### **5.1.2. Variables climáticas**

Las variables climáticas como temperatura ambiental, lluvia y nieve, fueron propuestas como posibles factores que predisponen la presentación de Cólera Aviar. En animales domésticos se demostró que la baja temperatura produce hipotermia, y que el estrés por frío predispone a los animales a padecer enfermedades (Thrusfield, 1990). Respecto a la fauna silvestre, Botzler (1991) considera que la temperatura ambiental podría aumentar la susceptibilidad de las aves silvestres al Cólera Aviar, ya que en Nebraska se produjeron 2 epizootias luego de varios días de tormenta y temperaturas muy bajas (Windingstad et al., 1988). Sin embargo, en el presente trabajo se demostró que en los meses de enero y febrero del año 2001 no hubo una correlación estadísticamente significativa entre la temperatura ambiental y la mortalidad de aves por Cólera



Aviar. Por lo tanto, se concluye que la temperatura ambiental no predispuso a las aves de Bahía Esperanza para contraer la enfermedad.

En algunos trabajos se propone la asociación entre las precipitaciones y el Cólera Aviar, aunque no se presentan datos que la comprueben (Rosen y Bischoff, 1949). En el Norte de California, las epizootias de esta enfermedad fueron descritas al inicio de la estación de lluvia, por lo cual se relacionó la severidad y la dispersión de la enfermedad con las precipitaciones (Rosen y Bischoff, 1950). Sin embargo, en temporadas sin lluvia se observó un aumento de las poblaciones de aves y se sugirió que esta alta densidad poblacional contribuyó con la epizootia registrada en California durante 1970-1971 (Rosen, 1972). En Bahía Esperanza se realizó un estudio observacional prospectivo para determinar la correlación de las precipitaciones (nieve y lluvia) con la mortalidad de las aves silvestres por Cólera Aviar y no se obtuvieron resultados significativos, por lo cual se concluye que las precipitaciones no favorecieron la presentación de la enfermedad.

Asimismo, se propuso que el viento puede condicionar la presentación de algunas enfermedades infecciosas (Thrusfield, 1990), aunque no se relacionó esta variable climática con Cólera Aviar. En el presente trabajo se demostró que durante la temporada reproductiva 2000-2001 el viento no estuvo relacionado con la presentación de esta enfermedad.

Aún no se demostró que el estrés climático pueda predisponer a las aves silvestres para contraer Cólera Aviar. Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente trabajo permitieron demostrar que las variables climáticas analizadas (temperatura ambiental, precipitaciones, y viento) no estuvieron asociadas a la mortalidad de aves durante el verano 2000-2001 en Bahía Esperanza.

## **5.2. HOSPEDADOR**

La capacidad de infección de un microorganismo y la posterior inducción de la enfermedad están relacionadas con la susceptibilidad inherente del hospedador y de si el mismo es inmune o no. Para que comience una epizootia transmitida por contacto, es necesario que exista una densidad mínima de animales susceptibles. Esto se denomina umbral mínimo y está definido matemáticamente por el teorema del umbral de Kendall (1957). Además, Schwabe et al. (1977) consideran para que una epizootia pueda propagarse en una población, se necesita como mínimo entre un 20 y un 30% de individuos susceptibles. Según avanza la epizootia, la proporción de individuos susceptibles disminuye, ya sea porque los animales mueren o porque adquieren inmunidad luego de la infección. Finalmente, la mortalidad puede detenerse porque no existe un número suficiente de animales susceptibles a la infección. Por lo tanto, es necesario que transcurra un cierto período de tiempo para la reposición de los individuos antes que pueda comenzar otra epizootia. Esto explica la ciclicidad de algunas enfermedades (Thrusfield, 1990).

En Bahía Esperanza, desde la década de 1980 se registraron 5 mortalidades de aves. Una posible causa para explicar estos hallazgos es que las poblaciones de aves fueron afectadas en forma cíclica por una enfermedad infectocontagiosa como Cólera Aviar. Es interesante mencionar que los 5 episodios estuvieron asociados a la estación de cría o reproductiva, aunque las poblaciones afectadas por la enfermedad no fueron analizadas durante sus rutas migratorias. Sin embargo, en la estación reproductiva aumenta la concentración de aves de diferentes especies que nidifican en Bahía Esperanza y por lo tanto aumenta el contacto entre ellas. Posiblemente *P. multocida* fue introducida en el ecosistema de Bahía Esperanza estableciendo una onda epizootica primaria entre las aves que no estuvieron expuestas previamente a la enfermedad. Esta interacción entre el hospedador y el agente, posiblemente favoreció el incremento gradual de la presencia de la enfermedad.

Se considera que la susceptibilidad de un hospedador al Cólera Aviar puede estar influenciada por características distintivas como especie, sexo, edad, estado físico y comportamiento. Los escasos estudios realizados al respecto, revelaron que el sexo, la edad y el estado físico no tuvieron relación con la presentación de la enfermedad (Oddo et al., 1978; Mensik y Botzler 1989). Sin embargo, el comportamiento de las aves es uno de los factores de riesgo más importantes en la presentación de Cólera Aviar (Combs, 1988).

### **5.2.1. Especie**

Algunas especies de aves silvestres afectadas por Cólera Aviar fueron más susceptibles que otras, e inclusive comenzaron a morir antes (Botzler, 1991). Las aves acuáticas como las gallaretas presentaron mayor susceptibilidad al Cólera Aviar y tuvieron lesiones compatibles con un cuadro agudo (Rosen y Morse, 1959). En contraste, las aves rapaces como halcones y lechuzas presentaron un cuadro crónico y fueron menos susceptibles (Morishita et al., 1996). Por lo tanto, la susceptibilidad de la especie afectada podría ser establecida según las lesiones patológicas.

En Bahía Esperanza durante enero y febrero del año 2001 las poblaciones de gaviota cocinera, skua y pingüino Adelia estuvieron implicadas en un brote de Cólera Aviar. El brote presentó una curva temporal epizootica prolongada, posiblemente debido a un vehículo común de larga exposición (Figura 39). Sin embargo, cada una de las especies afectadas tuvo un comportamiento diferente ante la enfermedad: a) cada especie presentó una distribución temporal de muertes diferente (Figura 40), y b) las gaviotas presentaron un cuadro crónico de la enfermedad, los skuas subagudo y los pingüinos agudo.

Según Coria y Montalti (1993) la población de gaviotas cocineras en Bahía Esperanza disminuyó entre 1980 y 1990. Considerando el resultado de los censos poblacionales realizados por Coria y Montalti (1993) y los presentados en este trabajo, es posible sugerir que la población

de gaviotas cocineras se mantuvo constante desde 1990 hasta el año 2003. Una posible explicación a este hallazgo es que estas aves hayan padecido una enfermedad infecciosa y que las gaviotas que sobrevivieron hayan logrado un equilibrio con el agente etiológico. Mediante los hallazgos de necropsia se confirmó que algunas gaviotas cocineras son más resistentes al Cólera Aviar, ya que durante el verano 1999-2000 las gaviotas muertas por esta enfermedad presentaron un cuadro subagudo y durante el verano 2000-2001 crónico. La población de gaviotas cocineras estables no fue afectada durante la temporada reproductiva 2000-2001, posiblemente porque no compartieron el sitio de asentamiento de las aves no reproductivas.

En los skuas se observó una curva temporal epizoótica de tipo propagativo, cuyo origen pudo ser un vehículo común de exposición esporádica. Este tipo de curva pudo deberse a la variación del número de aves expuestas a la fuente de infección, a una mayor resistencia de las aves a la enfermedad, a un mayor período de incubación de la enfermedad en esta especie, o a una fluctuación en la cantidad de bacterias en la fuente de infección. Durante el verano 2000-2001, los adultos no reproductivos fueron los únicos skuas afectados por Cólera Aviar y durante los veranos 2001-2002 y 2002-2003 no murieron aves por esta enfermedad. Inclusive, la mortalidad de skuas en los últimos 2 veranos de vigilancia fue inferior (1,8%) a la del verano 2000-2001 (30,6%). Después de la alta mortalidad durante el verano 2000-2001, la población de skuas susceptibles quizás no fue suficiente para desencadenar un nuevo brote de la enfermedad (Schwabe, 1977). Además, la población de skuas en Bahía Esperanza presentó un bajo número de ejemplares en relación a la cantidad de pingüinos Adelia, aproximadamente un skua cada 4.000 pingüinos. Este hallazgo es inusual si se compara con otras áreas de nidificación de la Antártida (Hahn et al., 1998), y podría indicar que la población de skuas de Bahía Esperanza no tiene una buena capacidad de reposición de individuos. Lamentablemente, no se dispone de datos

históricos para determinar si el número de skuas en Bahía Esperanza fue disminuyendo. Sin embargo, al comparar los resultados obtenidos durante los 3 veranos de vigilancia epizootiológica se observó un aumento gradual en el número total de skuas, principalmente en adultos no reproductivos.

Según Wobeser (1992), una epizootia de Cólera Aviar en aves acuáticas es explosiva y solo al finalizar la mortalidad se pueden observar aves enfermas. En Bahía Esperanza solo fue explosiva la mortalidad de pingüinos Adelia, aunque a diferencia de lo propuesto por Wobeser se observaron aves con signos de la enfermedad durante el brote y no al final. En los pingüinos Adelia la distribución de las muertes por Cólera Aviar fue similar a una curva temporal epizootica de tipo puntual, generalmente causada por un vehículo común de corta duración. Esta distribución tan particular pudo deberse a una exposición directa y breve a la fuente de infección, a una menor resistencia de los pingüinos a la enfermedad, o a un período de incubación más corto. Si bien estas aves presentaron un cuadro agudo, la mortalidad por Cólera Aviar fue muy baja ( $12,1^0/0000$ ). Sin embargo, no se pudo evaluar el verdadero impacto de la enfermedad en esta población debido a que las aves comenzaron a migrar en febrero del año 2001, cuando aún no había finalizado la epizootia.

### **5.2.2. Comportamiento**

Botzler (1991) consideró que el comportamiento de las aves es uno de los factores de riesgo más importantes en la presentación de Cólera Aviar, y que la característica más relevante es el agrupamiento poblacional. Además, Combs y Botzler (1991) demostraron que la mortalidad de aves acuáticas por Cólera Aviar estuvo directamente relacionada con el tamaño poblacional, el tiempo de asentamiento en tierra, la utilización del hábitat y la frecuencia de pastoreo de las aves en aguas poco profundas.

Durante el verano 2000-2001 en Bahía Esperanza murieron 3 especies de aves por Cólera Aviar, gaviotas cocineras, skuas y pingüinos Adelia.

Las gaviotas cocineras son aves migratorias y se caracterizan por colonizar nuevos ambientes. En las áreas costeras de la Argentina están asociadas a los basureros a cielo abierto (Figura 6). Si bien no se conocen las rutas migratorias de las gaviotas cocineras que arribaron a Bahía Esperanza en enero del año 2001, se considera que estas aves pudieron infectarse durante su migración y al ser menos susceptibles a la enfermedad pudieron ser el reservorio de *P. multocida*. Varios autores sugirieron que las aves silvestres pudieron infectarse en sus rutas migratorias. Rosen (1959) demostró que un grupo de aves enfermas recuperadas o portadoras, transmitieron Cólera Aviar a una distancia de 440 km, y McDiarmid (1962) aisló *P. multocida* en una golondrina (*Hirundo rustica*) que arribó a Inglaterra desde Africa. Wobeser et al. (1979) analizaron un brote de Cólera Aviar que afectó a gansos silvestres durante su migración primaveral. Por lo tanto, se sugiere que el comportamiento de las gaviotas durante su migración pudo favorecer la infección de estas aves por *P. multocida*.

En Bahía Esperanza los skuas se alimentan a expensas de la colonia de pingüino Adelia y comparten el nicho ecológico con las gaviotas cocineras. Durante el verano 2000-2001 las gaviotas cocineras no reproductivas que arribaron a Bahía Esperanza después del 1 de enero, se agruparon en torno a los mismos cuerpos de agua dulce que los skuas no reproductivos. Potter (1964) comprobó que las bacterias tienden a concentrarse en la superficie del agua, y por lo tanto las aves que se alimentan en la superficie de aguas contaminadas podrían exponerse regularmente a *P. multocida*. En Bahía Esperanza se demostró que uno de los cuerpos de agua dulce utilizados por las aves en la temporada 2000-2001 estaba contaminado con *P. multocida*. Sin embargo, durante las temporadas 2001-2002 y 2002-2003, no se encontraron aves muertas por Cólera

Aviar, coincidiendo con que las aves voladoras no reproductivas se agruparon alrededor de un chorrillo de agua corriente. Este cambio en el sitio de asentamiento de las aves se podría adjudicar a un cambio en el comportamiento, el cual pudo influir para que no se produzca un nuevo brote de la enfermedad.

Los pingüinos Adelia son aves de hábitos gregarios y la densidad poblacional en Bahía Esperanza es extremadamente alta, sin embargo la mortalidad por Cólera Aviar no fue elevada ( $12,1^{0}/_{0000}$ ). Los pingüinos Adelia y los skuas estables fueron las aves más afectadas por Cólera Aviar (97%), por el contrario las gaviotas cocineras muertas por esta enfermedad fueron esporádicas. Esta diferencia de comportamiento en los hábitos migratorios de los pingüinos y los skuas pudo favorecer la presentación de la enfermedad en estas especies.

Durante el verano 2000-2001, el resto de las especies de aves que nidifican en Bahía Esperanza no fueron afectadas por Cólera Aviar, posiblemente porque no compartieron el sitio de asentamiento con las gaviotas cocineras y los skuas no reproductivos.

### **5.2.3. Sexo**

El sexo del hospedador es un posible factor de riesgo para contraer Cólera Aviar. Korschgen et al. (1978) observaron que el 90% de los patos (*Somateria mollissima*) muertos en Maine, EE.UU., fueron hembras en incubación. Sin embargo, no se monitorearon los machos porque migran luego del apareamiento. Por otra parte, Mensik y Botzler (1989) demostraron que no hubo diferencias significativas entre el sexo de un grupo de gallaretas americanas muertas por Cólera Aviar, respecto del sexo de otro grupo de gallaretas cazadas.

Al analizar el sexo de los skuas y de los pingüinos Adelia muertos en Bahía Esperanza durante el brote de Cólera Aviar del verano 2000-2001, se demostró que no hubo diferencias

significativas respecto al sexo. Por lo tanto, se considera que el sexo de estas aves no fue un factor predisponente.

#### **5.2.4. Edad**

Si bien algunos autores relacionaron la prevalencia de Cólera Aviar con la edad (Hoffman y Stover, 1942; Morishita et al., 1996), no existen evidencias para considerar que este factor pueda afectar la susceptibilidad de las aves a la enfermedad (Botzler, 1991). El trabajo más importante relacionado con este tema indica que no se encontraron diferencias significativas al comparar la edad de un grupo de gallaretas americanas muertas por Cólera Aviar con otro grupo de gallaretas cazadas (Mensik y Botzler, 1989).

En este trabajo se demostró que en las poblaciones de skua y gaviota cocinera solo las aves no reproductivas o juveniles murieron por Cólera Aviar, y que los pingüinos Adelia adultos fueron significativamente más afectados por la enfermedad. Por lo tanto, se concluye que la edad puede predisponer a estas aves para contraer Cólera Aviar dependiendo de la especie afectada y por ende del comportamiento.

#### **5.2.5. Dieta**

En varias oportunidades se asoció a los hábitos alimentarios con la presentación de Cólera Aviar (Locke et al., 1972; Rosen et al., 1973). Esta asociación se realizó en base a los hallazgos de necropsia de aves rapaces muertas por la enfermedad (Thorne, 1982; Brogden y Rhoades, 1983; Morishita et al., 1996), aunque en raras ocasiones se pudo comparar cepas de *P. multocida* aisladas a partir del predador y de la presa. Sin embargo, Williams et al. (1986) describieron el caso de un halcón entrenado para cacería de patos que murió a las 48 h de haberse alimentado



con aves muertas por Cólera Aviar. De la carcasa del halcón y de los patos silvestres se aisló *P. multocida* A:1.

Entre las aves predatoras o carroñeras que nidifican en la Antártida se describió la muerte de un petrel gigante del sur por Cólera Aviar en las Islas Shetland del Sur (Leotta et al., 2003). En el presente trabajo se analizó la cepa de *P. multocida* aislada a partir de tejidos del petrel y se comparó con las cepas aisladas de las aves muertas por Cólera Aviar en Bahía Esperanza. Se demostró que todas las cepas fueron clonales y tuvieron un origen común. Posiblemente el petrel pudo alimentarse de las aves muertas en Bahía Esperanza durante el verano 1999-2000, enfermar y morir en la Isla 25 de Mayo, considerando que estas aves pueden volar más de 400 km por día (Marchant and Higgins, 1993). Además, en la Isla 25 de Mayo se ubica una importante colonia de petrel gigante del sur y no se observó ningún otro ejemplar muerto durante esa temporada.

Las aves más afectadas durante el brote de Cólera Aviar en Bahía Esperanza fueron los skuas. Estas aves pudieron infectarse al beber agua contaminada con *P. multocida*, o bien por alimentarse de pingüinos Adelia muertos. Esta hipótesis explicaría el tipo de curva propagativa que presentó la mortalidad de skuas, como así también la posible variación del número de aves expuestas a la fuente de infección, ya que se demostró que *P. multocida* puede sobrevivir hasta 120 días en las carcasas de aves enfermas (Botzler, 1991).

### **5.3. AGENTE**

La patogenicidad y la virulencia están determinadas por numerosas características del hospedador y del agente. El agente infeccioso debe ser capaz de multiplicarse en el hospedador y resistir los mecanismos de eliminación y defensa del mismo. Para ello depende de características intrínsecas condicionadas fenotípica o genotípicamente.

*Pasteurella multocida* fue el agente etiológico de los brotes de Cólera Aviar registrados en Bahía Esperanza durante los veranos 1999-2000 y 2000-2001, ya que las 56 cepas analizadas presentaron las mismas características fenotípicas y genotípicas. A continuación se analiza detalladamente cada una de las características analizadas.

### **5.3.1. Caracterización y subtipificación fenotípica**

En el presente trabajo se demostró que *P. m. gallicida* fue la única subespecie del género que circuló en Bahía Esperanza durante las temporadas reproductivas 1999-2000 y 2000-2001. En el trabajo realizado por Parmelee et al. (1979) se identificaron las cepas aisladas a partir de aves muertas en la Antártida aunque no se determinó la subespecie ni el biotipo. Por lo tanto, considerando los resultados previos (Leotta et al., 2003) y la caracterización de las cepas analizadas en el presente trabajo es posible concluir que *P. m. gallicida* es la subespecie más comúnmente aislada en la Antártida. Esta subespecie prevalece en las aves silvestres de hábitos acuáticos de EE.UU (Hirsh et al., 1990). Lamentablemente, se desconoce la subespecie y el biotipo de las cepas de *P. multocida* que circulan en las aves silvestres de otras regiones de la Argentina.

Según Fegan et al. (1995) y Koneman et al. (1999), *P. m. gallicida* se caracteriza por producir ácido a partir de xilosa, dulcitol y arabinosa, aunque la utilización de este último azúcar puede variar según la cepa. Las cepas aisladas de aves antárticas no produjeron ácido a partir de xilosa, aunque si lo hicieron a partir de dulcitol y arabinosa. En las cepas de *P. m. multocida* se describió que la producción de ácido a partir de xilosa es variable, por lo tanto en base a los resultados obtenidos en el presente trabajo se propone que las cepas de la subespecie *gallicida*

también pueden ser variables respecto a la utilización de este azúcar. Mutters et al. (1985) sugirieron como clave para la diferenciación de las especies del género *Pasteurella* la capacidad de decarboxilar la ornitina, sin embargo algunas cepas de *P. m. multocida* y *P. m. septica* aisladas de ganado vacuno y perros fueron ornitina negativas (Bisgaard et al., 1991; Mohan et al., 1994). Asimismo, Snipes et al. (1990) encontraron que el 6% de cepas aisladas de animales silvestres fueron ornitina decarboxilasa negativa. Por lo tanto, Fegan et al. (1995) consideraron que el valor de esta prueba es limitado para diferenciar especies y subespecies. Bisgaard et al. (1991) consideraron que se necesita la utilización de técnicas genéticas para determinar la posición taxonómica de cepas ornitina decarboxilasa negativas. Cuando se determinó la capacidad de decarboxilar la ornitina a las cepas aisladas en la Antártida se observó que no hubo crecimiento, por lo cual se confirmó su clasificación taxonómica mediante la secuenciación del gen 16S ARNr.

En el presente trabajo se identificó al 70,7% (29 cepas) de las 41 cepas de diferente origen como *P. m. multocida*, al 14,6% (6 cepas) como *P. m. gallicida* y al 7,3% (3 cepas) como *P. m. septica*. Esta relación, basada en la caracterización de las subespecies, concuerda con los resultados obtenidos por Fegan et al. (1995) y Blackall et al. (1999) en Australia, y por Snipes et al. (1990) en California. Sin embargo, las cepas analizadas por estos autores fueron aisladas en el contexto de estudios epidemiológicos y no obtenidas en forma azarosa.

Entre las cepas de diferente origen se analizaron 17 cepas de referencia, una fue la cepa de *P. m. gallicida* ATCC 51689 y 16 de ellas representan a cada uno de los serotipos descritos en el esquema propuesto por Heddleston (1972). Las cepas utilizadas en el esquema propuesto por Heddleston (Brogden et al., 1979) nunca se clasificaron según la subespecie y el biotipo. En el presente trabajo se encontró que 12 cepas fueron *P. m. multocida*, 2 *P. m. gallicida* y 2 *P. m.*

*septica*, una distribución similar a las mencionadas anteriormente. La cepa X-73 serotipo A:1, originalmente se describió como *P. m. multocida*, sin embargo en este trabajo se identificó como *P. m. gallicida*, ya que se caracterizó por producir ácido a partir de dulcitol. Es interesante destacar que 8 cepas no produjeron ácido a partir de xilosa, entre las que se encuentran las 2 cepas de *P. m. gallicida* y la cepa de referencia ATCC 51689.

Además, se analizaron 19 cepas aisladas de aves domésticas criadas en la Argentina y cerdos de la provincia de Buenos Aires. Según la cantidad de cepas identificadas *P. m. multocida* fue la subespecie más frecuente (16/19 cepas, 84,2%), luego *P. m. gallicida* (2/19 cepas, 10,5%) y finalmente *P. m. septica* (1/19 cepas, 5,3%). Las cepas de *P. m. multocida* provenientes de aves domésticas fueron biotipo1 (3/16 cepas, 18,7%) y biotipo 3 (13/16 cepas, 81,3%), considerando que las 10 cepas aisladas de cerdos fueron caracterizadas como *P. m. multocida* biotipo 3. Respecto a la utilización de azúcares, se destaca que 18 cepas de *P. m. gallicida* produjeron ácido a partir de xilosa y solo una cepa fue negativa. Considerando los resultados obtenidos con las cepas de *P. m. gallicida* analizadas en el presente trabajo se concluye que las mismas varían respecto a la utilización de xilosa, reforzando lo observado con las cepas aisladas en la Antártida.

Según Holmes et al. (1995) el 80-89% de las especies del género *Pasteurella* son indol positivas, entre las cepas aisladas de cerdos se encontró una cepa de *P. m. multocida* biotipo 3 que no produce indol.

Es interesante destacar que en Argentina, la caracterización fenotípica de cepas de *P. multocida* a nivel de subespecie y biotipo, no se realizó anteriormente. Sin embargo, estos resultados no son concluyentes, debido al bajo número de cepas analizadas. Se considera que para establecer la frecuencia de las distintas subespecies y biotipos de *P. multocida* en la

Argentina es necesario analizar un mayor número de cepas en el marco de estudios epidemiológicos.

Mediante la caracterización bioquímica no fue posible diferenciar las cepas aisladas en Bahía Esperanza de otras cepas de *P. m. gallicida* de diferente origen.

La serotipificación somática y la tipificación capsular se realizó mediante los esquemas de tipificación más utilizados en epizootias de Cólera Aviar en aves silvestres (Botzler, 1991). Las cepas de *P. m. gallicida*, aisladas en Bahía Esperanza, fueron tipificadas como tipo capsular A y serotipo somático 1. Esta es la combinación de tipo capsular y serotipo somático descrita con mayor frecuencia en los episodios de Cólera Aviar en aves silvestres de EE.UU. (Hirsh et al., 1990; Wilson et al., 1995), Canadá (Samuel et al., 1997; 1999) y Dinamarca (Pedersen et al., 2003). Además, cepas de *P. multocida* A:1 fueron aisladas en aves de la Antártida (Parmelee et al., 1979; Leotta et al., 2003) e Islas Subantárticas (de Lisle et al., 1990). En conclusión, la caracterización fenotípica de las cepas aisladas en Bahía Esperanza nos permite considerar que las cepas de *P. multocida* A:1, son las únicas vinculadas a las poblaciones de aves antárticas y subantárticas, y que su incidencia podría ser mayor si se incrementaran las investigaciones epizootiológicas en el área.

Respecto a las cepas de *P. multocida* de diferente origen analizadas en este trabajo, en las cepas aisladas de aves domésticas y cerdos el tipo capsular A fue el más frecuente, ya que 15 de 21 cepas (71,4%) presentaron este tipo capsular (Tablas 17 y 18). Entre las 9 cepas aisladas de gallinas reproductoras de Argentina, 8 presentaron tipo capsular A. Sin embargo, entre las cepas aisladas de cerdos 5 presentaron tipo capsular A y 5 tipo D; es interesante destacar que el tipo capsular D se encuentra asociado a la Rinitis Atrófica Porcina y las cepas analizadas fueron aisladas de pulmón de cerdos con neumonía sin lesiones en la cavidad nasal.

Las cepas aisladas de aves domésticas en la Argentina fueron heterogéneas respecto al serotipo somático, ya que presentaron serotipos 1, 3, 12, y 2x5. Las cepas aisladas de cerdos fueron más homogéneas presentando serotipo somático 3 y 5. Estos resultados contribuyen al conocimiento de las cepas de *P. multocida* que circulan en las poblaciones de animales de cría intensiva en la Argentina, ya que hasta el presente no se realizaron estudios epizootiológicos de Pasteurellosis.

Además de la identificación bioquímica, la tipificación capsular y la serotipificación somática, en el presente trabajo se determinó la susceptibilidad de las cepas analizadas a 11 antibióticos que se utilizan habitualmente en la producción de animales de cría intensiva como aves y cerdos. Todas las cepas de *P. multocida* aisladas en Bahía Esperanza fueron susceptibles a los antibióticos probados, este hallazgo sugiere que las cepas que circularon en Bahía Esperanza no sufrieron presión de selección con antibióticos de uso común en criaderos de animales domésticos, ni adquirieron mecanismos de resistencia a los antimicrobianos ensayados.

Entre las cepas de diferente origen se encontró que 3/17 cepas de referencia, 9/10 cepas aisladas de cerdos criados en la provincia de Buenos Aires y 1a cepa aislada en Uruguay de gallinas reproductoras presentaron resistencia a algunos de los antibióticos probados. Entre las cepas aisladas de cerdos se encontró resistencia a tiamulina y estreptomycin, por lo cual se considera que los tratamientos contra otras bacterias como *Mycoplasma* spp. podrían generar presión de selección sobre las cepas de *P. multocida* que afectan a las granjas productoras de cerdos. La cepa de *P. multocida* aislada en Uruguay presentó resistencia a enrofloxacin, un antibiótico cuya utilización se masificó en los últimos años.

En base a estos resultados se concluye que hasta el brote de Cólera Aviar del verano 2000-2001 en Bahía Esperanza, las cepas de *P. multocida* fueron susceptibles a los antibióticos

probados, sentando un importante precedente en el área. Es posible considerar que en el futuro el uso indiscriminado de antibióticos en los criaderos de animales domésticos pueda impactar en las poblaciones de aves que nidifican en la Antártida.

Debido al bajo poder discriminatorio que presentan las técnicas de tipificación basadas en características fenotípicas (Heddleston et al., 1976; Blackall y Miflin, 2000) no es posible concluir si las cepas aisladas en Bahía Esperanza se relacionan con cepas de otro origen. En diferentes estudios se utilizaron técnicas de tipificación fenotípica para el análisis de *P. multocida*, como por ejemplo biotipo, perfil plasmídico, serotipo, y tipo capsular, y se concluyó que para obtener resultados confiables era necesario subtipificar las cepas por métodos genotípicos (Blackall y Miflin, 2000; Pedersen et al., 2003).

### **5.3.2. Subtipificación molecular**

Para determinar la relación clonal de diferentes aislamientos de *P. multocida* se debe considerar la habilidad de la técnica de subtipificación para reconocer como iguales a cepas realmente iguales y como diferentes a cepas realmente diferentes. Maslow et al. (1993) propusieron distintos criterios para evaluar las técnicas de subtipificación, entre los cuales se describe el poder discriminatorio. Dicho parámetro se define como la probabilidad de una técnica para reconocer como diferentes a 2 cepas no relacionadas. Según Hunter y Gaston (1988) 0,9 es el mínimo valor de D (poder discriminatorio según el índice de Simpson) que debe presentar un esquema efectivo de subtipificación molecular. Para cumplir con el 5% de probabilidad aceptable (error tipo I) el valor ideal de D debe ser  $> 0,95$ , sin embargo, los sistemas de subtipificación que presentan un poder discriminatorio  $< 0,95$  pueden ser utilizados en combinación con otros sistemas para llegar a  $D = 0,95$  (Struelens et al., 1996).

Durante los últimos años varias técnicas de subtipificación molecular fueron utilizadas para el análisis de *P. multocida* (Wilson et al. 1993; Blackall y Miflin, 2000; Gunawardana et al., 2000; Amonsin et al., 2002), aunque los resultados obtenidos no fueron suficientes para establecer un método de referencia o “técnica de oro”. Para ello las técnicas destinadas a la subtipificación molecular de *P. multocida* deberían ser evaluadas según los criterios propuestos por Maslow et al. (1993).

En la actualidad existe una gran controversia acerca de cual es la técnica de subtipificación molecular más adecuada para el análisis de *P. multocida*. Snipes et al. (1989) obtuvieron buenos resultados al subtipificar una colección de cepas de *P. multocida* mediante *HhaI*-REA. Sin embargo, Wilson et al. (1995b) no obtuvieron una buena discriminación al analizar cepas de *P. multocida* aisladas de aves rapaces por *HhaI*- y *HpaII*-REA. Fussing et al. (1999) analizaron cepas de *P. multocida* productoras de dermonecrotina aisladas de cerdos mediante perfil plasmídico, fagotipificación y ribotipificación, y concluyeron que *HindIII*-ribotipificación fue la técnica con la que obtuvieron mejores resultados. Blackall y Miflin (2000) demostraron que el poder discriminatorio de *HhaI*-REA ( $D=0,86$ ) y *HpaII*-ribotipificación ( $D = 0,89$ ) fue más bajo que el mínimo recomendado por Hunter y Gaston (1988). En el mismo trabajo se demostró que MLEE presentó un índice discriminatorio de 0,97.

Las técnicas basadas en PCR no fueron utilizadas asiduamente para la subtipificación de *P. multocida*. Blackall y Miflin (2000) utilizaron los resultados obtenidos por Gunawardana et al. (2000) al analizar 44 cepas de *P. multocida* por REP-PCR y determinaron que el índice de discriminación de REP-PCR fue de 0,95. Asimismo, Paixao et al. (2004) analizaron 97 cepas de *P. multocida* aisladas de cerdos en Brasil mediante RAPD-PCR y AFLP y según sus resultados el índice discriminatorio para RAPD-PCR fue de 0,86 y para AFLP fue de 0,87. Huber et al. (2002)



analizaron 61 cepas de *P. multocida* aisladas de pavos y 9 cepas vacunales por RAPD-PCR y AFLP y demostraron que las vacunas estuvieron involucradas en la presentación de Cólera Aviar en las granjas bajo estudio. El desempeño de ambas técnicas fue satisfactorio pero el poder discriminatorio de las mismas no fue evaluado, sin embargo se demostró la importancia de las investigaciones epidemiológicas utilizando técnicas de subtipificación molecular. La técnica ERIC-PCR, descrita originalmente por Versalovic et al. (1991), fue utilizada por Amonsin et al. (2002) simultáneamente con AFLP (D=0,93) para subtipificar 47 cepas de *P. multocida* de origen aviar. El poder discriminatorio determinado por Amonsin et al. (2002) para ERIC-PCR (D=0,89) fue similar al obtenido con las cepas analizadas en el presente trabajo (D=0,90).

En el primer estudio que se utilizó PFGE se analizaron cepas de *P. multocida* tipo D aisladas de cerdos, y se demostró la capacidad de la técnica de subtipificación para detectar cepas relacionadas (Donnio et al., 1994). Townsend et al. (1997) analizaron 19 cepas de *P. multocida* tipo capsular B, aisladas en Asia y Norteamérica, utilizando *SmaI*- y *NotI*-PFGE. Los perfiles obtenidos permitieron establecer diferencia entre las cepas y además agruparlas en 2 grandes clusters según su origen. Es interesante mencionar que las mismas cepas no pudieron ser diferenciadas por serotipificación, perfil proteico y ribotipificación, demostrando la utilidad de PFGE en estudios de epidemiología molecular. Posteriormente, Gunawardana et al. (2000) subtipificaron 95 cepas de *P. multocida* aisladas de pollos y pavos por *ApaI*-PFGE, y pudieron distinguir varios brotes de Cólera Aviar relacionados epidemiológicamente. Pedersen et al. (2003) utilizaron *SmaI*- y *ApaI*-PFGE, y *HpaII*-REA para analizar 91 aislamientos de *P. multocida* y obtuvieron una mayor cantidad de patrones con PFGE. Sobre la base de estos resultados los autores concluyeron que PFGE tuvo un desempeño superior a REA, ribotipificación, RAPD y REP-PCR. Lainson et al. (2002) obtuvieron mejores resultados con

*AvaI*-PFGE que con RAPD-PCR al analizar cepas de *P. multocida* aisladas de cerdos. A diferencia de RAPD y REP-PCR, PFGE es una técnica que presenta buena reproducibilidad inter e intralaboratorios (Pedersen et al., 2003).

De acuerdo con la definición de Tenover et al. (1995), los brotes de Cólera Aviar ocurridos durante los veranos 1999-2000 y 2000-2001 en Bahía Esperanza, fueron ocasionados por un único clon de *P. multocida* definido mediante distintas técnicas de subtipificación molecular. Las cepas de *P. m. gallicida* aisladas de las aves silvestres y de un cuerpo de agua dulce en Bahía Esperanza, y la cepa aislada de un petrel gigante del sur, muerto en las Islas Shetland del Sur (Leotta et al., 2003), presentaron el mismo patrón molecular por ERIC-PCR, *ApaI*- y *SmaI*-PFGE, por lo cual es posible inferir que estas cepas tuvieron un origen común.

El patrón único obtenido con las cepas de *P. m. gallicida* A:1 aisladas en la Antártida durante los veranos 1999-2000 y 2000-2001, se diferenció de los patrones obtenidos con cepas de *P. multocida* de diferente origen. Aunque para obtener una mejor conclusión acerca del origen de Cólera Aviar en la Antártida, sería necesario comparar las cepas aisladas en Bahía Esperanza con cepas de *P. multocida* aisladas de aves silvestres durante otros brotes en el área.

Si bien las cepas de *P. multocida* aisladas en la Antártida fueron indistinguibles genotípicamente, presentaron diferencias respecto a la especie aviar afectada (petrel gigante del sur, gaviota cocinera, skua y pingüino Adelia), al sitio geográfico (Bahía Esperanza e Isla 25 de Mayo) y al año de aislamiento (2000 y 2001). Estas características indicarían una remarcada estabilidad genética de las cepas, las cuales pudieron persistir en un reservorio a través del tiempo. Desafortunadamente, no fue posible comparar las cepas aisladas en Bahía Esperanza con aquellas aisladas en la Isla Litchfield (Parmelee et al., 1978) y en la Isla Campbell (de Lisle et al., 1990).

La estabilidad genética de *P. multocida* no fue estudiada en detalle. Sin embargo Wilson et al. (1995a) demostraron que 3 patrones moleculares obtenidos por *HpaII*-REA de *P. multocida* circularon entre 1978 y 1993 en Norteamérica afectando a miles de aves silvestres. Estos resultados permiten inferir que las cepas de *P. multocida* analizadas por Wilson et al. (1995a) fueron genéticamente estables a través del tiempo. Christensen et al. (1998) demostraron que varios brotes de Cólera Aviar en Dinamarca, fueron ocasionados por un mismo clon de *P. multocida* definido por ribotipificación. Estos resultados fueron confirmados posteriormente por Pedersen et al. (2003), quienes analizaron 91 cepas de *P. multocida* aisladas de aves silvestres y domésticas muertas por Cólera Aviar en Dinamarca, incluyendo las cepas analizadas por Christensen et al. (1998). Los autores concluyeron que las aves silvestres pudieron transmitir Cólera Aviar a las aves domésticas, ya que los patrones moleculares de las cepas de *P. multocida* aisladas de las aves silvestres obtenidos por *ApaI*- y *SmaI*-PFGE fueron indistinguibles del patrón más comúnmente hallado entre las cepas de aves domésticas. Samuel et al. (1999) demostraron que cepas de *P. multocida* aisladas de aves silvestres muertas por Cólera Aviar entre 1978 y 1993 en el Oeste de EE.UU presentaron patrones *HhaI/HpaII* similares.

En conclusión, estos hallazgos confirman que las cepas de *P. multocida* pueden ser estables genéticamente y que la recombinación entre diferentes clones no es frecuente en brotes relacionados. Además, se demostró que los clones de *P. multocida* analizados en distintos países pueden mantener su estabilidad genética a pesar de transmitirse entre diferentes especies, durante largos períodos de tiempo y en áreas geográficas distantes, al igual que se observó en los brotes de Cólera Aviar en Bahía Esperanza.

En el presente trabajo se comprobó que *ApaI*-PFGE es una técnica apropiada para el análisis de *P. multocida* en el contexto de estudios epidemiológicos. Sobre un total de 41 cepas

analizadas, *ApaI*-PFGE (D=0,98) presentó mayor poder discriminatorio que ERIC-PCR (D=0,90). Estos resultados reafirman el valor de PFGE para estudios epidemiológicos, tal como lo describió Donnio et al. (1994), Gunawardana et al. (2000) y Pedersen et al. (2003).

Al analizar las 41 cepas de *P. multocida* de diferente origen se obtuvieron 8 clusters por *ApaI*-PFGE y 5 con ERIC-PCR. Se observó que los patrones moleculares obtenidos por ambas técnicas agruparon según la subespecie, el tipo capsular y el hospedador. Las cepas aisladas de cerdo presentaron mayor clonalidad que las aisladas de gallinas reproductoras y cepas de referencia, posiblemente porque tuvieron una distribución más homogénea en tiempo y espacio. Es interesante mencionar el hallazgo de una cepa de campo (011) que presentó el mismo perfil fenotípico y molecular que la cepa de referencia X-73 *P. m. gallicida* tipo A:1. Aunque no fue posible obtener datos epidemiológicos acerca del brote de Cólera Aviar que afectó a la granja, es posible especular que las aves pudieron ser vacunadas con cepas atenuadas obtenidas a partir de la cepa X-73.

Si bien se obtuvieron muy buenos resultados con PFGE y ERIC-PCR, en el futuro sería apropiado analizar un mayor número de cepas relacionadas epidemiológicamente y evaluar nuevas técnicas como tipificación de secuencias multilocus (MLST) o *multi-locus variable-number tandem repeat analysis* (MLVA) para la subtipificación de *P. multocida* aisladas en la Argentina.

En este trabajo se demostró el poder discriminatorio de las técnicas utilizadas y se comprobó que las cepas antárticas se diferenciaron del resto. Se considera que la utilización de estas técnicas combinadas con una continua y sistemática vigilancia epidemiológica en animales silvestres y domésticos pueden contribuir a: reconocer brotes de Pasteurelisis, establecer el

origen de los mismos, identificar las vías de transmisión, controlar la diseminación de cepas con resistencia a antibióticos y vigilar los programas de vacunación.

El análisis final de los resultados obtenidos con ERIC-PCR y PFGE puede contribuir al desarrollo de estrategias de vigilancia epidemiológica en áreas de asentamiento de aves silvestres.

### **5.3.3. Otros microorganismos**

La interacción de *P. multocida* con otros microorganismos no se evaluó totalmente. Sin embargo, se demostró que algunas aves silvestres tuvieron mayor predisposición a enfermar de Cólera Aviar por padecer micosis causadas por *Aspergillus* spp. y micotoxicosis (Robinson et al., 1982; Windingstad et al., 1989). En Bahía Esperanza, durante la década de 1960 y a comienzos del siglo XXI, se identificaron diferentes especies de hongos filamentosos asociados con las construcciones realizadas por el hombre, pero no se aisló *Aspergillus* spp. (Corte y Daglio, 1963; Comerio y Mac Cormack, 2004). Tampoco se aislaron especies del Género *Aspergillus* a partir de muestras provenientes de aves de las Islas Orcadas del Sur y Shetland del Sur (Leotta et al., 2000). Sin embargo, en el año 2000 se aisló *Aspergillus niger* de los efluentes domiciliarios de la Base Antártica Jubany, Isla 25 de Mayo, Islas Shetland del Sur (Reinoso et al., 2002).

En Bahía Esperanza, durante la temporada reproductiva 2000-2001, se realizó el diagnóstico diferencial sobre las carcasas de las aves que murieron por Cólera Aviar. Al realizar el diagnóstico microbiológico no se aislaron, ni detectaron, los agentes etiológicos de las enfermedades con lesiones macroscópicas y microscópicas similares a Cólera Aviar, entre las que se incluyeron Aspergilosis, Micoplasmosis, Salmonelosis, Coligranuloma, Influenza Aviar, Enfermedad de Newcastle, Laringotraqueitis y Bronquitis Infecciosa. Por lo tanto, se consideró a *P. m. gallicida* tipo A:1, como el único agente etiológico entre las aves muertas.

De algunas aves muertas por Cólera Aviar durante el verano 2000-2001 se aisló *T. microsporus*, *E. tarda* y *E. coli* enteropatógeno, aunque se considera que la baja incidencia de estos microorganismos no predispuso a las aves para contraer Cólera Aviar.

*Thelebolus microsporus* fue aislado a partir de muestras traqueales de skuas muertos en Bahía Esperanza pero no fue asociado con la muerte de las aves (Leotta et al., 2002). Asimismo, este *Ascomycete* psicrófilo, fue aislado a partir de hisopados cloacales y traqueales de skuas vivos sin sintomatología de enfermedad en las Islas Orcadas del Sur y Shetland del Sur (Leotta et al., 2000). Se considera que las aves antárticas son portadoras de *T. microsporus* y que lo podrían adquirir en el ecosistema antártico, ya que se lo encuentra asociado al medio ambiente polar (Montemartini Corte, 1993; de Hoog et al., 2005).

Se considera que *E. tarda* es un patógeno potencial para las aves antárticas (Shellam, 1998). Cook et al. (1985) describieron la muerte de 41 pingüinos rockhopper (*Eudyptes crestatus*) cuando fueron transportados de Chile a EE.UU. y demostraron que 8 ejemplares murieron con un cuadro de enteritis hemorrágica provocado por *E. tarda*. Los estudios sobre esta enterobacteria realizados en el Continente Antártico e Islas Subantárticas son escasos, sólo se aisló de muestras fecales de 2 pingüinos papua sanos (Zunino et al., 1985) y en el 13,5 % de las poblaciones de pingüino Adelia, pingüino papua, gaviota cocinera, paloma antártica y skua de Bahía Esperanza (Leotta et al., 2001). Probablemente estas aves podrían ser un reservorio de *E. tarda*, la cual puede provocar enfermedad en aves inmunosuprimidas. Sin embargo, *E. tarda* no provoca lesiones similares a las observadas en las aves muertas por Cólera Aviar.

*Escherichia coli* enteropatógeno nunca fue descrito en aves Antárticas, ni como patógeno de aves silvestres. Se concluye que estas aves podrían ser portadoras asintomáticas de EPEC. Esta enterobacteria es un patógeno humano que causa enfermedades entéricas, por lo cual

las aves portadoras serían un factor de riesgo para las poblaciones humanas en la Antártida, ya que estas aves generalmente se agrupan en torno a los cuerpos de agua dulce de los que se extrae el agua para consumo humano.

#### **5.4. RESERVORIO Y TRANSMISION DE *P. multocida* EN BAHIA ESPERANZA**

La ecología de Cólera Aviar no se conoce por completo porque no se conoce el origen de *P. multocida* en los sitios epizoóticos. En algunos brotes de Cólera Aviar se asoció el origen de la enfermedad con carnívoros silvestres como mapaches y zorros (Olsen y Wilson, 2001), insectos (Quortrup et al., 1946; Derylo, 1970; Krinsky, 1976), animales domésticos y roedores silvestres (Rhoades y Rimler, 1989). El posible origen de Cólera Aviar en Bahía Esperanza no presenta demasiadas opciones, debido al aislamiento geográfico de la Antártida, a la ausencia de animales domésticos, roedores y vectores invertebrados. Además, no existen registros de aislamiento de *P. multocida* a partir de mamíferos marinos y las condiciones climáticas extremas no contribuyen a la sobrevivencia de la bacteria durante largos períodos en el ambiente (Bredy y Botzler, 1989).

Heddleston (1972) propuso que el tiempo de vida de un ave portadora es el único límite en la duración de un estado de portador crónico. Botzler (1991) consideró que las aves silvestres portadoras son el principal reservorio de Cólera Aviar, y Wobeser (1992) sugirió que la enfermedad es perpetuada por aves acuáticas portadoras, aunque reconoció que la evidencia expuesta no es concluyente.

Se define como “reservorio” a la fuente no clínica de un patógeno, y al lugar donde el agente infeccioso puede sobrevivir durante un año. Para Cólera Aviar en aves silvestres se propusieron 2 grandes reservorios: a) el ambiente de sitios enzoóticos y b) aves portadoras (Botzler, 1991). Sin embargo, aún no se pudo demostrar el reservorio de *P. multocida* en ambientes naturales afectados por Cólera Aviar.

El brote de Cólera Aviar que afectó a las aves de Bahía Esperanza durante el verano 2000-2001, fue similar a otros brotes de esta enfermedad en aves silvestres de distintos lugares del mundo (Samuel et al., 1999; Pedersen et al., 2003). Sin embargo, las cepas de *P. multocida* aisladas durante el verano 2000-2001 fueron indistinguibles de aquellas aisladas en el verano 1999-2000, por lo cual se sugiere que hubo un reservorio en el que *P. multocida* se mantuvo viable entre los 2 veranos.

La epizootia ocurrida durante el verano 2000-2001 comenzó con la muerte de una gaviota cocinera no reproductiva con un cuadro crónico de Cólera Aviar. Diez días previos a este hallazgo, 107 gaviotas cocineras arribaron a Bahía Esperanza. En consecuencia se considera que durante ese verano las gaviotas cocineras desencadenaron el brote de Cólera Aviar y posiblemente fueron el reservorio de la enfermedad. Además, en los meses previos a la epizootia no se encontraron aves muertas por Cólera Aviar y durante la epizootia no se aisló *P. multocida* de pingüinos Adelia, skuas y palomas antárticas sin signología de Cólera Aviar. Sin embargo, no se pudo reforzar esta hipótesis debido a la imposibilidad de coleccionar muestras de las gaviotas cocineras no reproductivas sin signología de la enfermedad.

Diferentes autores sugirieron que varias especies de gaviotas podrían ser reservorio de Cólera Aviar (Vaught et al., 1967; Korschgen et al., 1978). Rosen y Bischoff (1950) observaron que un grupo de gaviotas se alimentó de desechos de pollos y transportaron *P. multocida* a las poblaciones de aves acuáticas del lugar originando un brote de Cólera Aviar. Titche (1979) aisló *P. multocida* en 15 de 37 gaviotas californianas (*Larus californicus*) y comprobó que 9 de las gaviotas positivas habían comido carne contaminada con *P. multocida*. Además, se demostró que 6 de esas 9 gaviotas diseminaron la bacteria en sus heces hasta 120 h pos-ingesta. Sin embargo,



para confirmar que las gaviotas cocineras que arriban a Bahía Esperanza son el reservorio de Cólera Aviar se debería analizar a estas aves en distintos períodos durante sus rutas migratorias.

Si bien se demostró que la fuente de diseminación de *P. multocida* durante el verano 2000-2001 fue un cuerpo de agua dulce, no se pudo demostrar que el ambiente de Bahía Esperanza fue reservorio de la enfermedad. Para confirmar el rol del ambiente se debería realizar un estudio sistemático durante todo el año y no únicamente en los meses de verano.

Las aves muertas en Bahía Esperanza en 1981 y 1990 fueron halladas en torno al Lago Boeckella (cuerpo de agua dulce 8), y aquellas muertas en 1997 y 2000 fueron halladas en torno a los cuerpos de agua dulce 7 y 4, respectivamente (Figura 7). Durante los veranos 2000-2001, 2001-2002 y 2002-2003, estos cuerpos de agua dulce recibieron aporte orgánico de la colonia de pingüino Adelia y tuvieron un pH superior a 7. Durante el verano 2000-2001, se demostró que los cuerpos de agua dulce 4, 7 y 8, no estaban contaminados por *P. multocida* a pesar de presentar algunas características adecuadas para la sobrevivencia de la bacteria, por lo cual se concluye que estos cuerpos de agua dulce no fueron reservorio de la enfermedad, principalmente el cuerpo de agua 4, el cual estuvo asociado a la epizootia del verano 1999-2000.

Durante la epizootia del verano 2000-2001, 68/71 (96%) aves muertas por Cólera Aviar fueron halladas en torno a los cuerpos de agua dulce 1 y 2, sitio donde se asentaban los skuas y las gaviotas no reproductivas. Del cuerpo de agua 1 se aisló *P. m. gallicida* y del cuerpo de agua dulce 2 no. Sin embargo, ambos cuerpos de agua dulce presentaban las condiciones físicas y químicas óptimas para la sobrevivencia de la bacteria (Bredy y Botzler, 1989). Por lo tanto, la principal diferencia entre los cuerpos de agua dulce 4, 7 y 8, y los cuerpos de agua dulce 1 y 2, fue que estos últimos estuvieron asociados con skuas y gaviotas no reproductivos. En conclusión, distintos lugares de Bahía Esperanza presentaron las condiciones ambientales adecuadas para la

sobrevida de *P. multocida*, pero el brote de Cólera Aviar se desencadenó al combinarse el medio ambiente propicio, el hospedador susceptible y el agente etiológico.

La transmisión de *P. multocida* entre las poblaciones de aves susceptibles de Bahía Esperanza pudo ocurrir por ingestión, por inhalación de aerosoles de agua o por contacto ave-ave. A su vez, las aves enfermas pudieron reinfectar el agua de los charcos a través de descargas nasales y orales, potenciando la fuente de infección. El contacto directo pudo ser facilitado por la frecuente interacción entre las aves asentadas en torno de los cuerpos de agua dulce 1 y 2. Además, los skuas pudieron infectarse mediante la predación o el carroñeo de aves enfermas.

Se concluye que Cólera Aviar es una enfermedad exógena para la Antártida, ya que no se demostró la existencia de un reservorio ambiental, que la epizootia tuvo un mismo origen y que las aves autóctonas se infectaron a partir de una fuente común para todos los individuos. Las gaviotas cocineras originaron la epizootia y los cuerpos de agua dulce fueron la fuente de diseminación de *P. multocida*.

#### **5.5. OTRAS CAUSAS DE MUERTE EN LAS AVES DE BAHIA ESPERANZA**

La vigilancia epizootiológica de Bahía Esperanza durante 3 años consecutivos permitió determinar diferentes causas de muerte entre las aves del lugar.

Durante la temporada reproductiva 2000-2001 se diagnosticó Dermatitis Gangrenosa en 2 pingüinos Adelia y se hallaron aparentes masas tumorales en el espacio interdigital de 2 gaviotas, lesiones traumáticas en un pingüino Adelia y prolapso cloacal en un pingüino Adelia. Es interesante mencionar que estas aves fueron halladas en diferentes áreas de Bahía Esperanza pero ninguna de ellas en la zona donde se produjo el brote de Cólera Aviar.

Durante la temporada reproductiva 2001-2002, solo fue posible diagnosticar lesiones traumáticas en un ejemplar adulto de skua. Durante la temporada reproductiva 2002-2003, se

hallaron 2 pingüinos Adelia, 2 pingüinos papua y una paloma antártica con lesiones traumáticas. Además, en los pingüinos papua se encontraron granulomas parasitarios causados por *Cyclophyllideos*.

Estos hallazgos demuestran que las aves antárticas están expuestas a diversas enfermedades cuya expresión no suele ser detectada debido a que habitualmente no se realizan estudios relacionados con la sanidad de la fauna antártica.

## **5.6. CONTROL DE COLERA AVIAR EN LA ANTARTIDA**

En base a los resultados obtenidos se concluye que un adecuado modelo para el estudio epizootiológico de Cólera Aviar en aves antárticas debe identificar:

- a) Los factores que incrementan el riesgo de los hospedadores susceptibles a la infección.
- b) El reservorio de la enfermedad.
- c) La forma en que la enfermedad es introducida y transmitida en las poblaciones susceptibles.
- d) Los eventos que ocurren en las poblaciones afectadas durante una epizootia (dinámica de la enfermedad).
- e) El impacto final de una epizootia.

El conocimiento del ciclo biológico de un agente infeccioso es fundamental cuando se pretende seleccionar una estrategia de control. Para ello se debe conocer la forma de transmisión y mantenimiento de la infección, como así también las condiciones ecológicas que favorecen la sobrevivencia del agente infeccioso.

En la Antártida se desarrollan estudios sobre Monitoreo Ambiental en forma colaborativa y programada entre los países miembros del Tratado Antártico. Una de las estrategias para monitorear el ambiente antártico es el análisis sistemático de la dinámica poblacional de las aves,

el cual es coordinado por la CCAMLR ([www.ccamlr.org](http://www.ccamlr.org)) y el SCAR. En consecuencia, se vigila el hábitat y las poblaciones de aves antárticas, aunque no desde el punto de vista sanitario. Por lo tanto, podría optimizarse el esquema de Monitoreo Ambiental mediante la incorporación de un sistema de vigilancia que contemple aspectos epizootiológicos del Cólera Aviar y otras enfermedades infecciosas. Mediante un monitoreo programado y sistemático se puede identificar una epizootia en su comienzo y adoptar medidas prácticas para su control. En los últimos años, la CCAMLR creó e implementó un Esquema de Observación Científica Internacional destinado a reducir la mortalidad de aves asociada a la pesquería ([www.ccamlr.org/pu/E/e\\_pubs/am/p6.htm](http://www.ccamlr.org/pu/E/e_pubs/am/p6.htm)). Este tipo de aportes internacionales podría favorecer la investigación de enfermedades infecciosas que afectan a las aves antárticas durante sus rutas migratorias.

Para el control de Cólera Aviar en aves silvestres se propusieron varias estrategias (Friend, 1987; Botzler, 1991; Wobeser, 1992), muchas de ellas orientadas a prevenir y reducir la exposición de las aves susceptibles a la enfermedad y disminuir la contaminación de los ecosistemas acuáticos por *P. multocida* (Friend, 1987). Algunas de las estrategias propuestas fueron:

- a) Recolección y análisis de aves muertas (Friend, 1987).
- b) Control del movimiento migratorio de las aves mediante la utilización de aviones o señuelos (Friend, 1987).
- c) Desinfección de los cuerpos de agua dulce (Rosen y Bischoff, 1949).
- d) Manipulación del hábitat (Friend, 1987).
- e) Tratamiento de las aves con antibióticos (Queen y Quortrup, 1946; Zuydam, 1952).
- f) Vacunación de las aves susceptibles (Samuel et al., 1999, Botzler, 1991).

g) Estrategias combinadas como por ejemplo desinfección de charcos e incineración de carcasas, huevos y nidos de aves afectadas (Gershman et al., 1964).

En la actualidad y debido a la legislación internacional vigente (Tratado Antártico y Protocolo de Madrid), solo una de las estrategias propuestas para el control de Cólera Aviar puede ser aplicada en la Antártida, la recolección y eliminación de aves muertas. Esta estrategia podría prevenir grandes pérdidas, ya que las carcasas son una fuente potencial de contaminación. Las aves muertas habitualmente contienen una gran cantidad de *P. multocida* que contribuye a la contaminación ambiental (Titcher, 1979; Rosen y Bischoff, 1950; Price y Brand, 1984) y pueden atraer aves carroñeras al lugar contaminado, facilitando la diseminación de la enfermedad hacia otros sitios. Por este motivo se debe contemplar un adecuado tratamiento de las carcasas, ya que su manipulación también es un factor de riesgo. A pesar de estas consideraciones, la eliminación de carcasas no es suficiente para prevenir un brote de Cólera Aviar y en el futuro se deberá evaluar la aplicación de otra estrategia combinada o alternativa.

## **5.7. MONITOREO EPIZOOTIOLÓGICO DE AVES ANTÁRTICAS**

La realización de investigaciones epizootiológicas sobre las poblaciones de aves antárticas es necesaria para poder estimar la incidencia de enfermedades y mortalidades, como así también determinar su origen y los factores de riesgo más frecuentemente involucrados en la transmisión de las mismas. Es importante identificar los agentes etiológicos existentes para facilitar el diagnóstico de futuras mortandades, como así también para prevenir el ingreso de enfermedades exóticas al ecosistema antártico.

El Artículo 4 del Anexo II del Protocolo de Madrid ([www.conama.cl/portal/1255/fo-article-26075.pdf](http://www.conama.cl/portal/1255/fo-article-26075.pdf)) se refiere a la “introducción de especies, parásitos y enfermedades no autóctonas” y se destaca que cada Parte debe solicitar que se tomen precauciones para impedir la

introducción de microorganismos como virus, bacterias, parásitos, y hongos ausentes en la fauna y flora nativa. En el Apéndice C se describe: “Aves de corral: no se introducirán aves vivas en la zona del Tratado Antártico. Antes que las aves preparadas para su consumo sean empaquetadas para su envío al Area del Tratado Antártico, serán sometidas a una inspección para detectar enfermedades, como enfermedad de Newcastle, tuberculosis o infección por levaduras. Cualquier ave o partes de un ave no consumidas deberán ser retiradas del Area del Tratado Antártico o destruidas por incineración o medios equivalentes que eliminen los riesgos para la fauna y flora nativas”

En la actualidad y como se mencionó a lo largo de este trabajo, los conocimientos sobre microorganismos patógenos presentes en la fauna nativa son muy escasos e inclusive varias enfermedades infecciosas podrían afectar a las aves antárticas aunque todavía no fueron descritas. Por lo tanto y a diferencia de lo enunciado en el Artículo 4 del Anexo II del Protocolo de Madrid, no es posible prevenir eventos de los cuales no se tiene conocimiento. Se considera necesaria la enmienda del Apéndice C del Anexo II mediante la ampliación de la lista de agentes infecciosos que no deberían ingresar al Area del Tratado Antártico, incluyendo a los microorganismos que afectan a las aves antárticas y a las aves silvestres en general. Entre ellos se encuentra *P. multocida*, agente etiológico de Cólera Aviar. Inclusive, en el mismo Apéndice se menciona que las aves domésticas destinadas al consumo humano deben estar libres de infecciones por levaduras. Las infecciones por levaduras son infrecuentes en aves domésticas y nunca fueron descritas en aves antárticas. Por lo tanto se considera que el Apéndice C, además de incluir los microorganismos patógenos para aves silvestres, debe ser actualizado según las investigaciones realizadas en los últimos años.

En el IV Comité de Protección Ambiental (CEP) ([www.cep.aq/MediaLibrary/asset/MediaItems/ml\\_376375567013889\\_wpone.pdf](http://www.cep.aq/MediaLibrary/asset/MediaItems/ml_376375567013889_wpone.pdf)) se presentó el Primer Informe sobre Revisión y Valoración de Riesgo, realizado por el Grupo de Contacto Intersesional Permanente sobre las Enfermedades de la Fauna Antártica. El mencionado Grupo estuvo coordinado por Australia y conformado por representantes de la ASOC, IAATO, Italia, Noruega y Suecia. Se proporcionó una revisión sobre los agentes etiológicos que podrían afectar a la fauna antártica y se realizó una valoración del riesgo de las actividades humanas. Con el objetivo de reducir el impacto humano se propusieron medidas prácticas para evitar la introducción de agentes infecciosos al Area del Tratado Antártico. Asimismo, se propusieron medidas prácticas para determinar la causa de la mortalidad de animales antárticos.

Entre las actividades realizadas por el hombre fuera del Area del Tratado Antártico y consideradas de riesgo se mencionaron las siguientes: viajes internacionales, visitas a granjas, mataderos, y plantas procesadoras de alimentos; visitas a zoológicos y bioterios; y liberación de animales cautivos. Entre las actividades realizadas por el hombre dentro del Area del Tratado Antártico se enumeraron las siguientes: importación de equipamiento y vehículos; importación de plantas y animales no autóctonos; importación de comida; eliminación de residuos; tratamiento de efluentes; basura de cocina; alimentación de la fauna antártica; campamentos; visitas y trabajo con animales de diferentes colonias; turismo; cebo de pesca; y hallazgos de mortalidades inusuales de animales antárticos.

En el Informe presentado al CEP se sugiere que la transmisión de enfermedades infecciosas a la fauna antártica podría estar vinculada a las condiciones ambientales y a la conducta de las aves. Además, se sugiere que algunas aves antárticas pueden infectarse o enfermarse en sus rutas migratorias, ya que podrían alimentarse en áreas contaminadas como

basurales o efluentes humanos. Inclusive, se sugirió que las gaviotas son las aves más propensas a enfermarse en los basurales debido a su familiarización con el ser humano, y que las aves carroñeras podrían contraer una enfermedad infecciosa al alimentarse de animales enfermos o agonizantes.

En el presente trabajo se demostró que las gaviotas que arribaron a Bahía Esperanza en el verano 2000-2001 fueron más resistentes al Cólera Aviar y que la transmisión de la enfermedad en skuas y pingüinos Adelia se produjo por el consumo de agua dulce contaminada con *P. multocida*. Además, se demostró que el comportamiento, la especie y la edad de las aves fueron variables predisponentes para la manifestación del Cólera Aviar. Por lo tanto, se demostraron algunas de las sugerencias mencionadas en el Informe sobre Revisión y Valoración de Riesgo presentado en el IV CEP.

Este trabajo es un antecedente para establecer e implementar futuras medidas de vigilancia, monitoreo, prevención y control de las enfermedades que afecten a la fauna antártica, las cuales podrán utilizarse como parámetro biológico para evaluar y preservar el estado sanitario del ecosistema antártico.



## **6. CONCLUSIONES**

- 6.1. Se realizó el primer trabajo de vigilancia epizootiológica en un área definida de la Antártida, en el cual durante 20 años se observaron mortalidades inusuales de aves.
- 6.2. Durante los veranos 1999-2000 y 2000-2001, el Cólera Aviar fue la causa primaria de la mortalidad de aves en Bahía Esperanza.
- 6.3. Las especies implicadas en el brote de Cólera Aviar fueron pingüino Adelia, skua y gaviota cocinera.
- 6.4. En los pingüinos Adelia la distribución de muertes por Cólera Aviar fue similar a una curva temporal epizoótica de tipo puntual. Si bien estas aves presentaron un cuadro agudo de la enfermedad, la mortalidad por Cólera Aviar fue muy baja. No se pudo evaluar el verdadero impacto de la enfermedad en esta población debido a que las aves comenzaron a migrar en febrero del año 2001, cuando aún no había finalizado la epizootia.
- 6.5. En los skuas se observó una curva temporal epizoótica de tipo propagativo. Durante el verano 2000-2001 los adultos no reproductivos fueron los únicos skuas afectados por Cólera Aviar y durante los veranos 2001-2002 y 2002-2003 no murieron aves por esta enfermedad. La población de skuas fue la más afectada por Cólera Aviar y no presentó una buena capacidad de reposición de individuos. Sin embargo, al comparar el resultado de los censos poblacionales obtenidos durante los 3 veranos de vigilancia epizootiológica

se observó un aumento gradual en el número total de skuas, principalmente en adultos no reproductivos.

- 6.6. Las gaviotas cocineras originaron la epizootia de Cólera Aviar en Bahía Esperanza durante el verano 2000-2001. Los hallazgos de necropsia permitieron confirmar que las gaviotas cocineras fueron más resistentes a la enfermedad, ya que presentaron Cólera Aviar crónico. De la cavidad bucofaríngea de estas aves se aislaron 2 cepas de *P. multocida* idénticas a las aisladas de skuas muertos durante el brote de Cólera Aviar en Bahía Esperanza en la temporada reproductiva 1999-2000. La población de gaviotas cocineras estables no fue afectada durante la temporada reproductiva 2000-2001 y se mantuvo constante durante los 3 años de vigilancia epizootiológica. Una posible explicación a este hallazgo es que la población de gaviotas cocineras haya padecido Cólera Aviar y que las aves que sobrevivieron a la enfermedad hayan alcanzado un equilibrio con la bacteria convirtiéndose en portadoras de *P. multocida*.
  
- 6.7. La edad de las aves estuvo asociada estadísticamente con la presentación de Cólera Aviar en Bahía Esperanza, sin embargo se concluye que el comportamiento de las gaviotas cocineras y de los skuas no reproductivos fue un factor predisponente para la presentación de la enfermedad. Durante el período de vigilancia epizootiológica, distintos lugares de Bahía Esperanza presentaron las condiciones ambientales adecuadas para la sobrevivencia de *P. multocida*, pero el brote de Cólera Aviar se desencadenó en el verano 2000-2001, cuando las gaviotas cocineras y los skuas no reproductivos se agruparon alrededor de

cuerpos de agua dulce, combinando el medio ambiente propicio, el hospedador susceptible y el agente etiológico.

- 6.8. Los cuerpos de agua dulce fueron la fuente de diseminación y transmisión de *P. m. gallicida* tipo A:1 a las aves de Bahía Esperanza. Por primera vez se aisló, caracterizó y subtipificó una cepa de *P. multocida* proveniente de agua ambiental durante un brote de Cólera Aviar. Además, se demostró que el agua de los charcos en torno a los que se asentaron las aves durante el verano 2000-2001 presentaban las condiciones físicas y químicas óptimas para la sobrevivencia de la bacteria.
- 6.9. Se demostró que *P. m. gallicida*, tipo capsular A y serotipo somático 1, fue el único fenotipo que circuló en Bahía Esperanza durante los veranos 1999-2000 y 2000-2001. Todas las cepas de *P. multocida* aisladas en Bahía Esperanza fueron susceptibles a los antibióticos probados, sentando un importante precedente en el área.
- 6.10. Hasta el presente no se habían caracterizado a nivel de subespecie, biotipo, tipo capsular y serotipo somático, cepas de *P. multocida* aisladas de animales domésticos de cría intensiva provenientes de la Argentina. Se considera que para establecer la frecuencia de las distintas subespecies y biotipos de *P. multocida* en animales domésticos criados en la Argentina es necesario analizar un mayor número de cepas en el marco de estudios epidemiológicos.

- 6.11. Se comprobó que *ApaI*-PFGE es una técnica apropiada para establecer la relación clonal de cepas de *P. multocida* en el contexto de estudios epidemiológicos. Sobre un total de 41 cepas analizadas *ApaI*-PFGE presentó mayor poder discriminatorio que ERIC-PCR (D=0,98 contra D=0,90).
- 6.12. Los brotes de Cólera Aviar ocurridos durante los veranos 1999-2000 y 2000-2001 en Bahía Esperanza, fueron ocasionados por un único clon de *P. multocida* definido mediante distintas técnicas de subtipificación molecular. Las cepas de *P. m. gallicida* aisladas en Bahía Esperanza y la cepa aislada de un petrel gigante del sur muerto en las Islas Shetland del Sur, presentaron el mismo patrón molecular por ERIC-PCR, *ApaI*- y *SmaI*-PFGE, por lo cual es posible asumir que estas cepas tuvieron un origen común. Las cepas de *P. multocida* aisladas en la Antártida afectaron a diferentes especies aviares (petrel gigante del sur, gaviota cocinera, skua, y pingüino Adelia), en distintos sitios geográficos (Bahía Esperanza e Isla 25 de Mayo) y durante dos años consecutivos (2000 y 2001). Estas características indican una remarcada estabilidad genética de las cepas, las cuales pudieron persistir en un reservorio a través del tiempo.
- 6.13. Las variables climáticas: temperatura ambiental, precipitaciones (nieve y lluvia) y viento no estuvieron asociadas a la mortalidad de aves durante el verano 2000-2001 en Bahía Esperanza.
- 6.14. Las aves antárticas están expuestas a diversas enfermedades cuya expresión no suele ser detectada debido a que habitualmente no se realizan estudios relacionados con la sanidad

de la fauna antártica. Sin embargo, durante la temporada reproductiva 2000-2001 en Bahía Esperanza, se realizó el diagnóstico diferencial sobre las carcasas de las aves que murieron por Cólera Aviar y no se diagnosticó Aspergilosis, Micoplasmosis, Salmonelosis, Coligranuloma, Influenza Aviar, Enfermedad de Newcastle, Laringotraqueitis, ni Bronquitis Infecciosa. De algunas carcasas se aisló *T. microsporus*, *E. tarda* y *E. coli* enteropatógeno, aunque se puede considerar que la baja incidencia de estos microorganismos no predispuso a las aves para contraer Cólera Aviar.

- 6.15. Cólera Aviar es una enfermedad exógena para la Antártida. En la actualidad y debido a la legislación internacional vigente (Tratado Antártico y Protocolo de Madrid), solo una de las estrategias propuestas para el control de Cólera Aviar puede ser aplicada en la Antártida, la recolección y eliminación de aves muertas.
- 6.16. Se considera necesaria la enmienda del Apéndice C del Anexo II mediante la ampliación de la lista de agentes infecciosos que no deberían ingresar al Area del Tratado Antártico, incluyendo a los microorganismos que afectan a las aves antárticas y a las aves silvestres en general. Entre ellos se encuentra *P. multocida*, agente etiológico de Cólera Aviar. Se considera que el Apéndice C, además de incluir los microorganismos patógenos para aves silvestres, debe ser actualizado según las investigaciones realizadas en la Antártida en los últimos años.
- 6.17. El esquema de Monitoreo Ambiental desarrollado por CCAMLR podría optimizarse mediante la incorporación de un sistema de vigilancia que contemple aspectos

epizootiológicos del Cólera Aviar y otras enfermedades infecciosas. Mediante un monitoreo programado y sistemático se podrá identificar una epizootia en su comienzo y adoptar medidas prácticas para su control.

- 6.18. En el presente estudio epizootiológico de Cólera Aviar en aves antárticas se identificaron:
- a) los factores que incrementaron el riesgo de las aves susceptibles a la infección, b) el reservorio de la enfermedad, c) la forma en que la enfermedad fue introducida y transmitida en las poblaciones susceptibles, d) los eventos que ocurrieron en las poblaciones afectadas durante la epizootia (dinámica de la enfermedad), y e) el impacto final de la epizootia. Estas son algunas de las pautas para el estudio de las enfermedades que afectan a la fauna antártica propuestas en forma teórica en el IV Comité de Protección Ambiental (CEP) que presentó el Primer Informe sobre Revisión y Valoración de Riesgo, realizado por el Grupo de Contacto Intersesional Permanente sobre las Enfermedades de la Fauna Antártica.
- 6.19. El presente trabajo es un antecedente para establecer e implementar futuras medidas de vigilancia, monitoreo, prevención y control de las enfermedades que afecten a la fauna antártica, las cuales podrán utilizarse como parámetro biológico para evaluar y preservar el estado sanitario del ecosistema antártico.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Abbas AK, Lichtman AH Inmunología celular y molecular. 5<sup>th</sup> ed. Madrid, España: Elsevier Science, Grafos SA; 2004.
2. Acero JM, Agraz JL, Aguirre CA. Revisión ambiental de las actividades Argentinas en Bahía Esperanza, Península Antártica. Publicación Especial del I.A.A. N° 26. 1996.
3. Acero JM, Agraz JL, Sanchez RA, Genest EA. Guía para la protección del medio ambiente antártico. Programa de Gestión Ambiental. Contribución del I.A.A. N° 526. 2001.
4. Amonsin A, Wellehan JFX, Li LL, Laber J, Kapur V. DNA fingerprinting of *Pasteurella multocida* recovered from avian sources. J Clin Microbiol 2002;40:3025-31.
5. Antarctic and Southern Ocean Coalition. Disponible en: URL: <http://www.asoc.org>. 13 de octubre de 2005.
6. Appleby EC. Mycosis of the respiratory tract in penguins. Proc Zool Soc London 1962;139:395-402.
7. Austin FJ, Webster RG. Evidence of ortho and paramixoviruses in fauna from Antarctica. J Wildl Dis 1993;29:568-71.
8. Backstrand JM, Botzler RG. Survival of *Pasteurella multocida* in soil and water in an area where avian cholera is enzootic. J Wildl Dis 1986;22:257-9.
9. Baumeister E, Leotta G, Pontoriero A, Campos A, Montalti D, Vigo G, et al. Serological evidences of Influenza A virus infection in Antarctic migratory birds. . Options for the Control of Influenza V. International Congress Series 2004;1263:737-40.
10. Bhasin JL. Serological types of *Pasteurella multocida* isolated from turkeys and chickens in Canada. Can J Microbiol 1982;28:1078-80.

11. Bigland CH, Graesser FE, Penniford KS. An osteolytic mucormycosis in a penguin. *Avian Dis* 1961;5:367-70.
12. Bisgaard M, Houghton SB, Mutters R, Stenzl A. Reclassification of German, British and Dutch isolates of so called *Pasteurella multocida* obtained from pneumonic calf lungs. *Vet Microbiol* 1991;26:115-24.
13. Blackall PJ, Fegan N, Chew GTI, Hampson DJ. A study of the use of multilocus enzyme electrophoresis as a typing tool in fowl cholera outbreaks. *Avian Pathol* 1999;28:195-8.
14. Blackall PJ, Fegan N, Chew GTI, Hampson DJ. Population structure and diversity of avian isolates of *Pasteurella multocida* from Australia. *Microbiology* 1998;144:279-89.
15. Blackall PJ, Miflin JK. Identification and typing of *Pasteurella multocida*: a review. *Avian Pathol* 2000;29:271-87.
16. Blackall PJ, Pahoff JL, Marks D, Fegan N, Morrow CJ. Characterisation of *Pasteurella multocida* isolates from fowl cholera outbreaks on turkey farms. *Aus Vet J* 1995;72:135-8.
17. Botzler RG. Epizootiology of avian cholera in wildfowl. *J Wildl Dis* 1991;27:367-95.
18. Bredy J, Botzler RG. The effects of six environmental variables on the survival of *Pasteurella multocida* in water. *J Wildl Dis* 1989;25:232-9.
19. Brogden KA, Packer RA. Comparison of *Pasteurella multocida* serotyping systems. *Am J Vet Res* 1979;40:1332-5.
20. Brogden KA, Rhoades KR. Prevalence of serologic types of *Pasteurella multocida* from 57 species of birds and mammals in the United States. *J Wildl Dis* 1983;19:315-20.
21. Broman T, Bergstrom S, On SLW, Palmgren H, McCafferty DJ, Sellin M, Olsen B. Isolation and characterization of *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* from Macaroni Penguins (*Eudyptes chrysolophus*) in the Subantarctic Region. *Appl Env Microbiol* 2000;449-52.



22. Cameron AS. The isolation of a psittacosis-lymphogranuloma venereum (pl) agent from an emperor penguin *Aptenodytes forsteri* chick. Australian Journal of Experimental Biology and Med Sci 1968;46:647-9.
23. Capitini C, Herrero IA, Patel R, Ishitami MB, Boyce TG. Wound infection with *Neisseria weaveri* and a novel subspecies of *Pasteurella multocida* in a child who sustained a tiger bite. Clin Inf Dis 2002;34:74-6.
24. Carpenter ET, Snipes KP, Kasten RW, Hird DW, Hirsh DC. Molecular epidemiology of *Pasteurella multocida* in turkeys. Am J Vet Res 1991;52:1345-9.
25. Carter GR, de Alwis MC. Haemorrhagic septicaemia. In: Adlam C and Rutter JM editors. *Pasteurella* and Pasteurellosis. London Academic Press 1989. p. 131-60.
26. Carter GR. Studies on *Pasteurella multocida*. I.A hemagglutination test for the identification of serological types. Am J Vet Res 1955;16:481-4.
27. Chinen I, Rivas M, Soriano V, Miliwebsky E, Galvez GF, Chillemi G, et al. *Escherichia coli* eh11 gene-positive serotype O18ac:H31 associated with an outbreak of diarrhea in a neonatal nursery in Neuquén City, Argentina. J Clin Microbiol 2002;40:1225-9.
28. Choi K, Maheswaran SM, Felice LJ, Molitor TW. Relationship between the iron regulated outer membrane proteins and the outer membrane proteins of in vivo grown *Pasteurella multocida*. Vet Microbiol 1991;28:75-92.
29. Christensen JP, Dietz HH, Bisgaard M. Phenotypic and genotypic characters of isolates of *Pasteurella multocida* obtained from back-yard poultry and from two outbreaks of avian cholera in avifauna in denmark. Avian Pathol 1998;27:373-81.
30. Combs SM, Botzler RG. Correlations of daily activity with avian cholera mortality among wildfowl. J Wildl Dis 1991;27:543-50.

31. Combs SM. Behavioral ecology of coots and waterfowl at an avian cholera epornitic site, Humboldt County, California [tesis doctoral] Humboldt State University, Arcata, California; 1988.
32. Comerio RM, Mac Cormack W. Algunos micromicetes del suelo y de alimentos deteriorados en la Antártida Argentina. Rev Iberoam Micol 2004;21:128-34.
33. Comisión para la Conservación de los Recursos Vivos Marinos Antárticos. Disponible en: URL: [http://www.ccamlr.org/pu/E/e\\_pubs/amp6.htm#\(i\)Incidental](http://www.ccamlr.org/pu/E/e_pubs/amp6.htm#(i)Incidental). 13 de octubre de 2005.
34. Cook RA, Tappe JP. Chronic enteritis associated with *Edwardsiella tarda* infection in Rockhopper penguins. J Am Vet Med Ass 1985;187:1219-20.
35. Coria NR, Montalti D. Flying birds at Esperanza Bay, Antarctica. Polish Pol Res 1993;14:433-9.
36. Corte A, Daglio CAN. Micromicetes aislados en el antártico. Contribución del I.A.A. N° 74: 1-27. 1963.
37. Dabo SM, Debey BM, Montelongo M, Confer AW. DNA restriction site heterogeneity in bovine *Pasteurella multocida* serogroup A isolates detected with an rRNA probe. J Med Microbiol 1999;48:279-86.
38. De Hoog GS, Gottlich E, Platas G, Genilloud O, Leotta G, Brummelen JV. Evolution, taxonomy and ecology of the genus *Thelebolus* in Antarctica. Studies in Mycology 2005;51:33-76.
39. De la Vega SG. Antártida, las leyes entre las costas y el mar. Buenos Aires, Argentina: Contacto Silvestre Ediciones; 2000.

40. De Lisle GW, Stanislawek WL, Moors PJ. *Pasteurella multocida* infections in rockhopper penguins (*Eudyptes chrysocome*) from Campbell Island, New Zealand. J Wildl Dis 1990;26:283-5.
41. Derylo A. *Mallophaga* as a reservoir of *Pasteurella multocida*. Acta Par Pol 1970;17:301-13.
42. Derylo A. Wszoly (*Mallophaga*) jako wektory *Pasteurella multocida*. Annales Universitatis Mariae Curie-Sklodowska, Sectio C: Biologia 1969;24:355-66.
43. Dewhirst FE, Paster BJ, Olsen I, Fraser GJ. Phylogeny of the *Pasteurellaceae* as determined by comparison of 16S ribosomal ribonucleic acid sequences. Zentbl Bakteriol 1993;279:35-44.
44. Diallo IS, Bensink JC, Frost AJ, Spradbrown PB. Molecular studies on avian strains of *Pasteurella multocida* in Australia. Vet Microbiol 1995;46:335-42.
45. Dirección Nacional del Antártico. Instituto Antártico Argentino. Disponible en: URL: <http://www.dna.gov.ar>. 13 de octubre de 2005.
46. Donahue JM, Olson LD. Research technique. Inoculation of *Pasteurella multocida* into the palatine air spaces as an exposure method for fowl cholera in turkeys. Avian Dis 1971;15:158-62.
47. Donahue JM, Olson LD. Survey of wild ducks and geese for *Pasteurella* spp. Bulletin of the Wildl Dis Ass 1969;5:201-5.
48. Donnio PY, Le Goff C, Avril JL, Pouedras P, Gras-Rouzet S. *Pasteurella multocida*: oropharyngeal carriage and antibody response in breeders. Vet Res 1994;25:8-15.
49. Edwards & Ewing. Identification of *Enterobacteriaceae*. 4<sup>th</sup> Edition. En: Ewing WH editor. New York: Elsevier; 1986.

50. Evans AS. Causation and disease. The Henle-Koch postulates revisited. *Yale Journal of Biology and Medicine* 1976;49:175-95.
51. Fegan N, Blackall PJ, Pahoff JL. Phenotypic characterization of *Pasteurella multocida* isolates from Australian poultry. *Vet Microbiol* 1995;47:281-6.
52. Fichen MD, Barnes HJ. Acute airsacculitis in turkeys inoculated with *Pasteurella multocida*. *Vet Pathol* 1989;26:231-7.
53. Flach EJ, Stevenson FM, Henderson GM. Aspergillosis in Gentoo Penguins *Pygoscelis papua* at Edinburgh Zoo 1964 to 1968. *Vet Rec* 1990;126:81-5.
54. Foged NT. *Pasteurella multocida* toxin. The characterization of the toxin and its significance in the diagnosis and prevention of progressive atrophic rhinitis in pigs. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* 1992;100:1-56.
55. Foodborne and Diarrheal Diseases Branch, Division of Bacterial and Mycotic Diseases, National Center for Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Standardized Molecular Subtyping of Foodborne Bacterial Pathogens by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. A Training manual, Atlanta, GA, EE.UU. 1998.
56. Frey MC, Hanson RP, Anderson DP. A medium for the isolation of avian *Mycoplasma*. *Am J Vet Res* 1968;29:2164-71.
57. Friend M. Avian cholera. En: Friends M editor. *Field Guide to Wildlife Diseases, Vol 1: General Field Procedures and Diseases of Migratory Birds*. U.S. Fish and Wildlife Service Resource Publication N° 167, Washington, D.C.; 1987. p. 69-82.
58. Fujihara Y, Onai M, Koizumi S, Satoh N, Sowada T. An outbreak of fowl cholera in wild ducks (*Rosyibilled pochard*) in Japan. *Jap J Vet Sci* 1986;48:35-43.

59. Fussing V, Nielsen JP, Bisgaard M, Meyling A. Development of a typing system for epidemiological studies of porcine toxin producing *Pasteurella multocida* ssp. *multocida*. Vet Microbiol 1999;65:61-74.
60. Gardner HG, Kerry K, Riddle M. Poultry virus infection in Antarctic Penguins. Nature 1997;387:245.
61. Gauthier-Clerc M, Jaulhac B, Frenot Y, Bachelard C, Monteil H, Le Maho Y, et al. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* (the lyme disease agent) antibodies in king penguin *Aptenodytes patagonicus* in Crozet Archipelago. Pol Biol 1999;22:141-3.
62. Gershman M, Witter JF, Spencer HE, Kalvaitis JR. Epizootic of fowl cholera in the common eider duck. J Wildl Man 1964;28:587-9.
63. Glisson JR, Cheng I-HN. In vivo antigen expression by *Pasteurella multocida*. Avian Dis 1991;35:392-6.
64. Grimont F, Grimont PAD. Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. Annales Institut Pasteur/Microbiologie 1986;137:165-75.
65. Gunawardana GA, Townsend KM, Frost AJ. Molecular characterisation of avian *Pasteurella multocida* isolates from Australia and Vietnam by REP-PCR and PFGE. Vet Microbiol 2000;72:97-109.
66. Hahn S, Peter HU, Quillfeldt P, Reinhardt K. The birds of the Potter Peninsula, King George Island, South Shetland Islands, Antarctica, 1965-1998. Marine Ornithol 1998;26:1-6.
67. Hammer AS, Pedersen K, Andersen TH, Jorgensen JC, Dietz HH. Comparison of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from mink by serotyping and pulse-field gel electrophoresis. Vet Microbiol 2003;94:237-43.

68. Hazlewood RM, Oddo AF, Pagan RD, Botzler RG. The 1975-76 avian cholera outbreaks in Humboldt County, California. *J Wildl Dis* 1978;14:229-32.
69. Heddleston KL, Gallagher JE, Rebers PA. Fowl cholera; gel diffusion precipitin test for serotyping *Pasteurella multocida* from avian species. *Avian Dis* 1972;16:925-36.
70. Heddleston KL. Physiologic characteristics of 1,268 cultures of *Pasteurella multocida*. *Am J Vet Res* 1976;37:745-7.
71. Herrmann B, Rahman R, Bergström S, Bonnedahl J, Olsen B. *Chlamydophila abortus* in a brown skua (*Catharacta antarctica, lonnbergi*) from a sub-Antarctic Islands. *Appl Env Microbiol* 2000;66:3654-6.
72. Hirsh DC, Hansen LM, Dorfman IC, Snipes KP, Carpenter TE, Hird DW, et al. Resistance to antimicrobial agents and prevalence of R plasmids in *Pasteurella multocida* from turkeys. *Antim Agent Chem* 1989;33:670-3.
73. Hirsh DC, Jessup DA, Snipes KP, Carpenter TE, Hird DW, McCapes RH. Characteristics of *Pasteurella multocida* isolated from waterfowl and associated avian species in California. *J Wildl Dis* 1990;26:204-9.
74. Hirsh DC, Martin LD, Rhoades KR. Resistance plasmids of *Pasteurella multocida* isolated from turkeys. *Am J Vet Res* 1985;46:1490-3.
75. Hoffman HA, Stover DE. An analysis of thirty thousand autopsies on chickens. California Department of Agriculture Bulletin 1942;31:7-30.
76. Holmes B, Pickett MJ, Hollis DG. Unusual gram-negative bacteria, including *Capnocytophaga*, *Eikenella*, *Pasteurella*, and *Streptobacillus*. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Yolken RH editores. *Manual of Clinical Microbiology*. 6<sup>th</sup> ed. Washington D.C.: American Society for Microbiology; 1995.

77. Howie CA, Jones NV, Williams IC. A report on the death of sheathbills, *Chionis alba* (Gmalin), at Signy Island, South Orkney Islands, during the winter of 1965. Br Ant Surv Bull 1968;18:79-83.
78. Huber BS, Allred DV, Carmen JC, Frame DD, Whiting DG, Cryan JR, et al. Random amplified polymorphic DNA and amplified fragment length polymorphism analyses of *Pasteurella multocida* isolates from fatal fowl cholera infections. J Clin Microbiol 2002;40:2163-8.
79. Hudson JR. Pasteurellosis. En: Stableforth A y Galloway I editores. Infectious diseases of animals Vol 2. London, England. Butterworths Scientific Publ;1959. p. 413-36.
80. Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's Index of Diversity. J Clin Microbiol 1988;26:2465-6.
81. Ikeda JS, Hirsh DC. Possession of identical nonconjugative plasmids by different isolates of *Pasteurella multocida* does not imply clonality. Vet Microbiol 1990;22:79-87.
82. Informe del Grupo del Contacto Intersesional Permanente sobre las Enfermedades de la Fauna Antártica. Informe 1: Revisión y Valoración de Riesgo. IV CEP. Documento de Trabajo WP-10. Punto 4d de la Agenda de Australia. Disponible en: URL: [http://www.cep.aq/MediaLibrary/asset/MediaItems/ml\\_3763754375\\_wp010s.pdf](http://www.cep.aq/MediaLibrary/asset/MediaItems/ml_3763754375_wp010s.pdf). 13 de octubre de 2005.
83. International Association of Antarctica Tour Operators. Disponible en: URL: <http://www.iaato.org>. 13 de octubre de 2005.
84. International Committee on Systematics of Prokaryotes. Subcommittee on the Taxonomy of *Pasteurellaceae*. Copyright© 2005 ICSP. Last modified 9 May 2005. Disponible en: URL: <http://www.the-icsp.org/subcoms/Pasteurellaceae.htm>. 13 de octubre de 2005.

85. Izaguirre I, Vinocur A, Mataloni G, Pose M. Phytoplankton communities in relation to trophic status in lakes from Hope Bay (Antarctic Peninsula). *Hydrobiologia* 1998;369/370:73-87.
86. Kaschula VR, Trutter DE. Fowl cholera in sea gulls on Dassen Island. *Journal of the South African Veterinary Medical Association* 1951;22:191-2.
87. Kasten RW, Carpenter TE, Snipes KP, Hirsh DC. Detection of *Pasteurella multocida*-specific DNA in turkey flock by use of the polymerase chain reaction. *Avian Dis* 1997;41:676-82.
88. Kendall MG, Buckland WR. *A Dictionary of Statistical Terms*. 4<sup>th</sup> Ed. London and New York: Longman Group Limited; 1982.
89. Kerry K, Riddle M, Clarke J. *Diseases of Antarctic Wildlife*. A report for SCAR and COMNAP. Kingston, Australia: Australian Antarctic Division; 1999.
90. Kim CJ, Nagaraja KV. DNA fingerprinting for differentiation of field isolates from reference vaccine strains of *Pasteurella multocida* in turkeys. *Am J Vet Res* 1990;51:207-10.
91. Knights JM, Adlam C, Owen PL. Characterization of envelope proteins from *P. haemolytica* and *P. multocida*. *J Gen Microbiol* 1990;136:495-505.
92. Kodjo A, Villard L, Bizet C, Martel JL, Sanchis R, Borges E, et al. Pulsed Field Gel Electrophoresis is more efficient than Ribotyping and Random Amplified Polymorphic DNA analysis in discrimination of *Pasteurella haemolytica* strains. *J Clin Microbiol* 1999;37:380-5.
93. Koneman EW, Stephen DA, Williams MJ, Schrenberger PC, Washington CW. *Diagnóstico Microbiológico*. 5<sup>th</sup> ed. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana; 1999. p. 388-461.



94. Korschgen CE, Gibbs HC, Mendall HL. Avian cholera in eider ducks in Maine. *J Wild Dis* 1978;14:254-8.
95. Kotetishvili M, Stine OC, Kreger A, Morris JG Jr, Sulakvelidze A. Multilocus Sequence Typing for Characterization of Clinical and Environmental *Salmonella* Strains. *J Clin Microbiol* 2002;40:1626-35.
96. Krinsky WL. Animal disease agents transmitted by horse flies and deer flies (Diptera: *Tabanidae*). *J Med Entomology* 1976;13:225-75.
97. Lainson FA, Aitchison KD, Donachie W, Thomson JR. Typing of *Pasteurella multocida* isolated from pigs with and without porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *J Clin Microbiol* 2002;40:588-93.
98. Lee MD, Wooley RE, Brown J, Glisson JR. A survey of potential virulence markers from avian strains of *Pasteurella multocida*. *Vet Microbiol* 1991;26:213-25.
99. Leotta GA, Cerdá R, Coria NR, Montalti D. Preliminary studies on some avian diseases in Antarctic birds. *Polish Pol Res* 2001;22:227-31.
100. Leotta GA, Montalti D, Giacoboni GI. *Campylobacter lari* en aves antárticas. IX Congreso Argentino de Microbiología. Buenos Aires, Argentina; 2001. p. 176.
101. Leotta GA, Paré JA, Sigler L, Montalti D, Vigo GB, et al. *Thelebolus microsporus* mycelial mats in the trachea of wild brown skua (*Catharacta antarctica lonnbergi*) and South Polar skua (*C. maccormicki*) carcasses. *J Wildl Dis* 2002;38:443-7.
102. Leotta GA, Petruccelli MA, Montalti D, Reinoso EH. Mortality of brown and south polar skuas by hyphomycetes at Hope Bay, Antarctica. Workshop on Diseases of Antarctic Wildlife, Hobart, Australia; 1998. p. 50.

103. Leotta GA, Reinoso EH, Cordoba SB, Montalti D, Gunski RJ. Traqueal and cloacal fungi of the antarctic skuas *Catharacta* sp. 14th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology. Buenos Aires, Argentina; 2000. p. 188.
104. Leotta GA, Reinoso EH, Petruccelli MA, Vigo GB, Moredo F, Montalti D. Mortandad de skuas *Catharacta* spp. en Bahía Esperanza, Antártida. IV Jornadas Nacionales de Ciencias del Mar, Puerto Madryn, Argentina; 2000. p. 81.
105. Leotta GA, Rivas M, Chinen I, Vigo GB, Moredo FA, Coria N, et al. Avian Cholera in a Southern Giant Petrel (*Macronectes giganteus*) from Antarctica. J Wildl Dis 2003;39:732-5.
106. Leotta GA, Vigo G, Salve A, Pichel M, Pecoraro M, Binsztein N. Análisis de vacunas “9R” contra tifus aviar utilizadas en Argentina. XV Reunión Científico Técnica. Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico; 2004.
107. Leotta GA, Vigo GB, Nievas VF, Nievas WD, Igal SU, Aguirre JI. Prevalencia de *Edwardsiella tarda* en aves antárticas. III Congreso Argentino de Zoonosis, II Congreso Latinoamericano de Zoonosis. Buenos Aires, Argentina; 2001.
108. Locke LN, Newman JA, Mulhern BM. Avian cholera in a bald eagle from Ohio. Ohio Journal of Science 1972;72:294-6.
109. Mac Faddin JF Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Paramericana S.A.; 1980.
110. MacDonald JW, Conroy JHW. Virus disease resembling puffinosis in the gentoo penguin (*Pygoscelis papua*) on Signy Island, South Orkney Islands. British Antarctic Survey Bulletin 1971. p. 80-83.
111. Marchant S, Higgins PJ. Handbook of Australian, New Zealand and Antarctic Birds, Vol. 1. Melbourne: Oxford University Press; 1993.

112. Maslow JN, Slutsky AM, Arbeit RD. The application of pulse field gel electrophoresis to molecular epidemiology. En Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ editores. Diagnostic molecular microbiology: Principles and Applications Washington, D.C.: American Society of Microbiology; 1993. p. 563-72.
113. Matsumoto M, Strain JG, Engel HN. The fate of *Pasteurella multocida* after intratracheal inoculation in turkeys. Poultry Science 1991;70:2259-66.
114. Mayer LW. Use of plasmid profiles in epidemiologic surveillance of disease outbreaks and in tracing the transmission of antibiotic resistance. Clin Microbiol Rev 1988;1:228-43.
115. McDiarmid A. Diseases of free-living wild animals. Food and Agricultural Organization Studies N° 57. United Nations, Rome, Italy; 1962. p. 119.
116. Mensik JG, Botzler RG. Epizootiological features of avian cholera at Centerville, Humboldt County, California. J Wildl Dis 1989;25:240-5.
117. Mock M, Crasnier M, Duflot E, Dumay V, Danchin A. Structural and functional relationships between *Pasteurella multocida* and enterobacterial adenylate cyclases. J Bacteriol 1991;173:6265-9.
118. Mohan K, Sadza M, Madsen M, Hill FWG, Pawandiwa A. Phenotypic characterisation of Zimbabwean isolates of *Pasteurella multocida*. Vet Microbiol 1994;38:351-7.
119. Montalti D, Coria NR, Curtosi A. Unusual deaths of subantarctic skuas *Catharacta antarctica* at Hope Bay, Antarctica. Marine Ornithology 1996;24:39-40.
120. Montalti D, Soave GE, Camperi AR, Darrieu CA. El Orden *Charadriiforme* (Primera Parte). Cátedra de Ornitología, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata; 2003.

121. Montemartini Corte A, Caretta G, Del Frate G. Notes on *Thelebolus microsporus* isolated in Antarctica. *Mycotaxon* 1993;48:343-58.
122. Moore BW, Cameron AS. *Chlamydia* antibodies in Antarctic fauna. *Avian Dis* 1969;1113: 681-84.
123. Moore MK, Chubbs LC, Gates RJ. A new selective enrichment procedure for isolating *Pasteurella multocida* from avian and environmental samples. *Avian Dis* 1994;38:317-24.
124. Morgan IR, Caple IW, Westbury HA, Campbell J. Disease investigations of penguins and elephant seals on Macquarie Island. 1978; Research project series 47.
125. Morgan IR, Westbury HA. Virological Studies of Adelie Penguins (*Pygoscelis adeliae*) in Antarctica. *Avian Dis* 1981;25:1019-26.
126. Morishita TY, Lowenstine LJ, Hirsh DC, Brooks DL. *Pasteurella multocida* in raptors: prevalence and characterization. *Avian Dis* 1996;40:908-18.
127. Morishita TY, Lowenstine LJ, Hirsh DC, Brooks L. Lesions associated with *Pasteurella multocida* infection in raptors. *Avian Dis* 1997;41:203-13.
128. Mortimer G. Antarctic tourism-size and scope of the industry, and standard industry procedures for interacting with wildlife. Workshop on Diseases of Antarctic Wildlife, Hobart, Australia; 1998. p. 47.
129. Muhairwa AP. Prevalence, epidemiology, and virulence of *Pasteurella multocida* and related organisms obtained from poultry and their animal contacts [PhD Thesis]. Copenhagen: Department of Veterinary Microbiology, The Royal Veterinary and Agricultural University; 2000.
130. Multilocus Sequence Typing. Policy Document. Disponible en: URL: [http://www.mlst.net/misc/new\\_schemes.asp](http://www.mlst.net/misc/new_schemes.asp). 13 de octubre de 2005.

131. Murray MD. Ecology of the ectoparasites of seals and penguins. *Biologie Antarctique: Premier Symposium Organise par le SCAR, Paris; 1962.* R. Carrick, M. Holdgate, J. Prevost editores. Paris:Hermann 1964. p. 241-5.
132. Mutters R, Christensen H, Bisgaard M. Genus *Pasteurella* Trevisan 1887, 94<sup>AL</sup> Nom. cons. Opin. 13, Jud. Comm. 1954. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn, vol. 2. Edited by G. M. Garrity and others. New York: Springer. 2005.
133. Mutters R, Ihm P, Pohl S, Fredericksen W, Mannheim W. Reclassification of the genus *Pasteurella* Trevisan 1887 on the basis of deoxyribonucleic acid homology, with proposals for the new species *Pasteurella dagmatis*, *Pasteurella canis*, *Pasteurella stomatis*, *Pasteurella anatis*, and *Pasteurella langaa*. *Int J Syst Bacteriol* 1985;35:309-22.
134. Myrcha A, Tatur A, Del Valle R. Numbers of Adelie Penguin breeding at Hope Bay and Seymour Island rookeries (West Antarctica) in 1985. *Polish Pol Res* 1987;8:411-22.
135. Nakamine M, Ohshiro M, Ameku Y, Ohshiro K, Keruma T, Sawada T, et al. The first outbreak of fowl cholera in Muscovy ducks (*Cairina moschata*) in Japan. *J Vet Med Sci* 1992;54:1225-27.
136. Namioka S, Murata M. Serological studies on *Pasteurella multocida*. II. Characteristics somatic (O) antigen of the organism. *Cornell Vet* 1961;51:507-21.
137. National Committee For Clinical Laboratory Standards. Performance Standard for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard-Second Edition M 31-A2. Wayne, PA: NCCLS; 2002.
138. National Committee For Clinical Laboratory Standards. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically. Approved Standard sixth Edition Vol 23 M 7-A6. Wayne, PA: NCCLS; 2003.

139. Nauerby B, Madsen M. Analysis by pulsed-field gel electrophoresis of the genetic diversity among *Clostridium perfringens* isolates from chickens. *Vet Microbiol* 2003;94:257-66.
140. Nielsen JP, Bisgaard M, Pedersen KB. Production of toxin in strains previously classified as *Pasteurella multocida*. *Act Pathol Microbiol Imm Scand* 1986;94:203-4.
141. NORM-VET 2002. Consumption of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial resistance in Norway. Tromsø. Oslo; 2003.
142. Oddo AF, Pagan RD, Worden L, Botzler RG. The January 1977 avian cholera epidemic in northwest California. *J Wildl Dis* 1978;14:317-21.
143. Oelke H, Steinger F. *Salmonella* in Adelie Penguins (*Pygoscelis adeliae*) and South Polar Skuas (*Catharacta maccormicki*) on Ross Island, Antarctica. *Avian Dis* 1973;17:568-73.
144. Olsen B, Bergstrom S, McCafferty DJ, Sellin M., Wistrom J. *Salmonella* in Birds Islands, South Georgia Islands. *The Lancet* 1996;348:1319-20.
145. Olsen LD, Wilson MA. DNA fingerprint patterns of *Pasteurella multocida* from the same turkey farm on the same and different years. *Avian Dis* 2001;45:807-12.
146. Olson LD, Bond RE. Survival of *Pasteurella multocida* in soil, water, carcasses and in the mouths of various birds and mammals. *Proceedings of the Annual Meeting of the Livestock Sanitation Association* 1968;72:244-6.
147. Pabs-Garnon LF, Soltys MA. Methods of transmission of fowl cholera in turkeys. *Am J Vet Res* 1971;32:1119-20.
148. Paixao R, Moreno AM, Doto DS, Baccaro MR, Ferreira AJP, Gomes CR, et al. Genotypic characterization of *P. multocida* strains using RAPD and AFLP. *Proceedings of the 18<sup>th</sup> IPVS Congress, Hamburg, Germany; 2004.*

149. Palmgren H, Bergström S, Broman T, McCafferty DJ, Sellin M, Olsen B. Characterisation of *Salmonella* spp. isolated from Fur Seals and seabirds in Antarctica. *Epidemiology and Infection* 2000;125:257-62.
150. Parmelee DF, Maxson SJ, Bernstein NP. Fowl cholera outbreak among brown skuas at Palmer Station. *Antarctic Journal of the United States* 1979;14:168-9.
151. Pedersen K, Dietz HH, Jorgensen JC, Christensen TK, Bregnballe T, Andersen TH. *Pasteurella multocida* from outbreaks of avian cholera in wild and captive birds in Denmark. *J Wildl Dis* 2003;39:808-16.
152. Pedersen K, Jorgensen JC, Dietz HH, Andersen TH. Verrucous endocarditis associated with *Streptococcus bovis* in mink (*Mustela vison*). *Vet Rec* 2003;153:264-8.
153. Pedersen K, Wedderkopp. Resistance to quinolone among *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from Danish broilers at the farm level. *J Appl Microbiol* 2003;94:111-9.
154. Petersen KD, Christensen H, Bisgaard M, Olsen JE. Genetic diversity of *Pasteurella multocida* fowl cholera isolates as demonstrated by ribotyping and 16S rRNA and partial atpD sequence comparisons. *Microbiology* 2001;147:2739-48.
155. Petruccelli MA, Menéndez NA. Guía de Trabajos Prácticos. Técnicas de Necropsia de las Aves. Cátedra de Patología de Aves y Pilíferos. Instituto de Patología “Dr. Bernardo Epstein”; 1997.
156. Potter LF, Backer E. The microbiology of Flathead and Rogers Lakes, Montana. II. Vertical distribution of the microbial populations and chemical analyses of their environments. *Ecology* 1961;42:338-48.

157. Potter LF. Planktonic and benthic bacteria of lakes and ponds. In Principles and applications in aquatic microbiology. En: Heukelekian H. y Dondero N.C. editores. New York (NY): John Wiley and Sons, Incorporated. 1964. p. 148-61.
158. Price JL, Brand CJ. Persistence of *Pasteurella multocida* in Nebraska wetlands under epizootic conditions. J Wildl Dis 1984;20:90-4.
159. Price SB, Freeman MD, Macewen MW. Molecular analysis of a cryptic plasmid isolated from avian strains of *Pasteurella multocida*. Vet Microbiol 1993;37:31-43.
160. Pritchett IW, Beaudette FR, Hughes TP. The epidemiology of fowl cholera. IV. Field observations of the “spontaneous” disease. Journal of Experimental Medicine 1930;51:249-58.
161. Protocolo de Madrid al Tratado Antártico sobre Protección Ambiental. Disponible en: URL: <http://www.conama.cl/portal/1255/fo-article-26075.pdf>. 13 de octubre de 2005.
162. Prudhoe S. Cestodes from fish, birds and whales. B.A.N.Z.A.R.E. Reports VIII 1969:172-93.
163. Queen FB, Quortrup ER. Treatment of *Pasteurella multocida* (fowl cholera) infection in wild ducks with autogenous bacterin and penicillin. J Am Vet Med Ass 1946;108:101-3.
164. Quortrup ER, Queen FB, Merovka LJ. An outbreak of pasteurellosis in wild ducks. J Am Vet Med Ass 1946; 108:94-100.
165. Reed A, Cousineau JG. Epidemics involving the common eider (*Somateria mollissima*) at le Blanche, Quebec. Naturaliste Canadien 1967; 94:327-34.
166. Reinoso EH, Leotta GA, Córdoba SB. Aislamiento de Eumycetos en Efluentes Domiciliarios en Shetland del Sur, Antártida. IX Congreso Argentino de Micología. XIX Jornadas Argentinas de Micología. Resistencia, Chaco, Argentina; 2002.



167. Rhoades KR, Rimler RB. Pasteurelosis Aviar. En: Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, Reid WM, Yoder HW Jr editores. Enfermedades de las Aves. 9<sup>th</sup> ed. S.A. de C.V., México D.F.: El Manual Moderno; 1995. p. 171-93.
168. Rhoades KR, Rimler RB. Capsular groups of *Pasteurella multocida* isolated from avian hosts. Avian Dis 1987;31:895-8.
169. Rhoades KR, Rimler RB. Fowl cholera. En Adlam C, Rutter JM editores. *Pasteurella* and pasteurellosis. London, England: Academic Press; 1989. p. 95-113.
170. Rhoades KR. The microscopic lesions of acute fowl cholera in mature chickens. Avian Dis 1964;8:658-65.
171. Rimler RB, Rhoades KR. Serogroup F, a new capsule serogroup of *Pasteurella multocida*. J Clin Microbiol 1987;25:615-8.
172. Robinson RM, Ray AC, Reagor JC, Holland LA. Waterfowl mortality caused by aflatoxicosis in Texas. J Wildl Dis 1982;18:311-3.
173. Rosen MN, Bischoff AI. The 1948-49 outbreak of fowl cholera in birds in the San Fransisco Bay area and surrounding counties. California Fish and Game 1949;35:185-92.
174. Rosen MN, Bischoff AI. The epidemiology of fowl cholera as it occurs in the wild. Transactions of the North American Wildlife Conference. 1950;15:147-54.
175. Rosen MN, D'amico K, O'Neill J. First record of a golden eagle death due to avian cholera. California Fish and Game. 1973;59:209-10.
176. Rosen MN, Morse EE. An interspecies chain in a fowl cholera epizootic. California Fish and Game 1959;45:51-6.

177. Rosen MN. Avian cholera. En: Davis JW, Anderson RC, Karstad L, Trainer DO editores. Infectious and parasitic diseases of wild birds. Ames Iowa: The Iowa State University Press; 1971. p. 59-74.
178. Rosen MN. Species susceptibility to avian cholera. Bull Wildl Dis Ass 1969;5:195-200.
179. Rosen MN. The 1970-71 avian cholera epornitic's impact on certain species. J Wildl Dis 1972;8:75-8.
180. Ruffolo CG, Adler B. Cloning, sequencing, expression, and protective capacity of the *oma87* gene encoding the *Pasteurella multocida* 87-kilodalton outer membran antigen. Infect Immun 1996;64:3161-7.
181. Samuel MD, Goldberg DR, Shaddock DJ, Price JI, Cooch EG. *Pasteurella multocida* serotype 1 isolated from a lesser snow goose: evidence of a carrier state. J Wildl Dis 1997;33:332-5.
182. Samuel MD, Shaddock DJ, Goldberg DR, Baranyuk V, Sileo L, Price JI. Antibodies against *Pasteurella multocida* in snow geese in the Western Artic. J Wildl Dis 1999;35:440-9.
183. Schmidt HM. *Tetrameres (G.) Wetzeli* Sp. N. (Nematoda: *Spirurida*), Eine Neue tetrameresart aus den felsenpinguin, *Eudyptes chrysocome* Forst (Aves: *Sphenisciformes*). Z. F. Parasitenkunde 1965;26:71-81.
184. Schwabe WC, Riemann HP, Franti CE. Epidemiology in Veterinary Practice. Lea and Febiger, Philadelphia; 1977.
185. Scientific Committee on Antarctic Reasearch. Disponible en: URL: <http://www.scar.org>. 13 de octubre de 2005.

186. Shellam GR. Bacterial and viral infections of antarctic penguins. Workshop on Diseases of Antarctic Wildlife, Hobart, Australia; 1998. p. 54-5.
187. Simensen E, Olson LD. Aerosol transmission of *Pasteurella multocida* in turkeys. Avian Dis 1980;24:1007-10.
188. Snipes KP, Hirsh DC, Kasten RW, Carpenter TE, Hird DW, McCapes RH. Homogeneity of characteristics of *Pasteurella multocida* isolated from turkeys and wildlife in California, 1985-88. Avian Dis 1990;34:315-20.
189. Snipes KP, Hirsh DC, Kasten RW, Hansen LM, Hird DW, Carpenter TW, et al. Use of rNRA probe and restriction endonuclease analysis to fingerprint *Pasteurella multocida* isolated from turkeys and wildlife. J Clin Microbiol 1989;27:1847-53.
190. Snipes KP, Hirsh DC. Association of complement sensitivity with virulence of *Pasteurella multocida* isolated from turkeys. Avian Dis 1986;12: 65-75.
191. Soave GE, Camperi AR, Montalti D, Darrieu CA. El Orden *Charadriiformes* (Segunda Parte). Cátedra de Ornitología, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata; 2003.
192. Soave GE, Montalti D, Camperi AR, Darrieu CA. Guía de Trabajos Prácticos *Sphenisciformes, Procellariiformes, Pelecaniformes*. Cátedra de Ornitología, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata; 2003.
193. Spratt BG. Multilocus sequence typing: molecular typing of bacterial pathogens in an area of rapid DNA sequencing and the internet. Current Opinions in Microbiol 1999;139:1133-40.
194. Stern MJ, Ames GF, Smith NH, Robinson EC, Higgins CF. Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. Cell 1984;37:1015-26.

195. Stoskopf MK, Beall FB. The husbandry and medicine of captive penguins. Annual proceedings of the American Association of Zoo Veterinarians; 1980. p. 81-96.
196. Stoskopf MK, Beier J. Avian Malaria in African Black-footed penguins. JAVMA 1979;175:944-7.
197. Struelens MJ. and the Members of the European Study Group on Epidemiological markers (ESGEM), of the European Society for Clinical microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. Clin Microbiol Infect 1996;1:2-11.
198. Suarez JG, Ilazabal LL. Epidemia de Cólera en los patos marinos. Revista de Medicina Veterinaria (Buenos Aires) 1941;23:145-9.
199. Taller sobre Evaluación de Infecciones por Virus Influenza mediante Técnicas Serológicas. Manual Didáctico. Servicio Virosis Respiratorias, Departamento Virología, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas - ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán"; 2001.
200. Taylor TT, Pence DB. Avian cholera in common crows (*Corvus brachyrhynchos*) from the central Texas Panhandle. J Wildl Dis 1981;17:511-4.
201. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol 1995;33:2233-9.
202. The World Conservation Union. Disponible en: URL: <http://www.iucn.org>. 13 de octubre de 2005.
203. Thorne ET. Avian cholera. En: Thorne ET, Kingston N, Jolley WR, Bergstrom RC editores. Disease of wildlife in Wyoming. 2<sup>nd</sup> ed. Cheyenne, Wyoming: Wyoming Game and Fish Department; 1982. p. 77-81.

204. Thrusfield M. Epidemiología Veterinaria. Zaragoza, Espana: Editorial Acribia, S.A.; 1990.
205. Titche A. Avian cholera in California. Wildlife Management Branch Administrative Report 79-2. California Department of Fish and Game, Sacramento, California; 1979. p. 49.
206. Townsend KM, Boyce JD, Chung JY, Frost AJ, Adler B. Genetic organization of *Pasteurella multocida* cap loci and development of a multiplex capsular PCR typing system. J Clin Microbiol 2001;39:924-9.
207. Townsend KM, Dawkins HJ, Papadimitriou JM. Analysis of haemorrhagic septicaemia-causing isolates of *Pasteurella multocida* by ribotyping and field alteration gel electrophoresis (FAGE). Vet Microbiol 1997;57:383-95.
208. Townsend KM, Frost AJ, Lee CW, Papadimitriou JM, Dawkins HJ. Development of PCR assays for species- and type-specific identification of *Pasteurella multocida* isolates. J Clin Microbiol 1998;36:1096-1100.
209. Tratado Antártico. Disponible en: URL: [http://www.opanal.org/NWFZ/Antartico/antartico\\_sp.pdf](http://www.opanal.org/NWFZ/Antartico/antartico_sp.pdf). 13 de octubre de 2005.
210. Trivelpiece W, Butler RG, Volkman N. Pygoscelid penguin research in Admiralty Bay. Antarctic Journal of the United States 1981;16:150-2
211. Truscott WM, Hirsh DC. Demonstration of an outer membrane protein with antiphagocytic activity from *Pasteurella multocida* of avian origin. Infect Immun 1988;56:1538-44.
212. Unzaga JM, Leotta GA, Larsen A, Bacigalupe D, Basso W, Venturini C, et al Seroprevalencia anti-*Toxoplasma gondii* en aves que nidifican en Península Antártica, Península Potter y Punta Armonía, Antártida. XIV Reunión Científico Técnica. Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico; 2002.

213. Van den Hurk CFGW. Aanteekeningen bij de epizootie van vogelcholera over Nederland in het najaar van 1945. Tijdschrift voor Diergeneeskund 1946;71:361-5.
214. Vaught RW, McDougle HC, Burgess HH. Fowl cholera in waterfowl at Squaw Creek National Wildlife Refuge, Missouri. J Wildl Management 1967;31:248-53.
215. Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids Res 1991;19:6823-31.
216. Vigo GB, Leotta GA, Nievas WD, Coria NR, Terragno R, Alcain A, et al. *Salmonella* en aves antárticas. IX Congreso Argentino de Microbiología. Buenos Aires, Argentina; 2001. p. 175.
217. Weinberg ED. Iron and infection. Microbiological Review 1978;42:45-66.
218. Wetzell R, Rieck W. Krankheiten des Wildes. Verlag Paul Parey, Hamburg, Federal Republic of Germany; 1972. p. 256.
219. Williams ES, Runde DE, Mills K, Holler LD. Avian cholera in a gryfalcon (*Falco rusticolus*). Avian Dis 1987;31:380-2.
220. Wilson MA, Duncan RM, Nordholm GE, Berlowski BM. *Pasteurella multocida* isolated from wild birds of North America: a serotype and DNA fingerprint study of isolates from 1978 to 1993. Avian Dis 1995a;39:587-93.
221. Wilson MA, Duncan RM, Nordholm GE, Berlowski BM. Serotypes and DNA fingerprint profiles of *Pasteurella multocida* isolated from raptors. Avian Dis 1995b;39:94-9.
222. Wilson MA, Morgan MJ, Barger GE. Comparison of DNA fingerprinting and serotyping for identification of avian *Pasteurella multocida* isolates. J Clin Microbiol 1993;31:255-9.

223. Wilson MA, Rimler RB, Hoffman LJ. Comparison of DNA fingerprints and somatic serotypes of serogroup B and E *Pasteurella multocida* isolates. J Clin Microbiol 1992;30:1518-24.
224. Wilson SS. A bibliography of references to avian cholera. U.S. Fish and Wildlife Service Special Scientific Report – Wildlife N° 217, Washington D.C.; 1979. p. 18.
225. Windingstad RM, Cole RJ, Nelson PE, Roeff TJ, George RR, Dorner JW. *Fusarium* mycotoxins from peanuts suspected as cause of sandhill crane mortality. J Wildl Dis 1989;25:38-46.
226. Windingstad RM, Duncan RM, Thornburg D. Outbreak of avian cholera on the wintering grounds of the Mississippi Valley Canada goose flock. J Wildl Dis 1983;19:95-7.
227. Windingstad RM, Kerr SM, Duncan RM, Brand CJ. Characterization of an avian cholera epizootic in wild birds in western Nebraska. Avian Dis 1988;32:124-31.
228. Wobeser G.A. Avian cholera. En: Diseases of Wild Waterfowl. New York (NY): Plenum Press; 1981. p. 47-60.
229. Wobeser GA, Hunter DB, Wright B, Nieman DJ, Isbister R. Avian cholera in waterfowl in Saskatchewan, Spring 1977. J Wildl Dis 1979;15:19-24.
230. Wobeser GA. Avian cholera and Waterfowl Biology. J Wildl Dis 1992;28:674-82.
231. Zdzitowiecki K, Drodz J. Redescription of *Stegophorus macronectes* (Jonhston et Mawson, 1942) and description of *Stegophorus arctowskii* sp.n. (Nematoda: *Spirurida*) from birds of South Shetlands (the Antarctic). ACTA Parasitologica Polonica 1980;27:205-12.
232. Zhao G, Pijoan C, Choi K. Expression of Iron-regulated outer membrane proteins by porcine strains of *Pasteurella multocida*. Can J Vet Res 1995;59:46-50.

233. Zinkl JG, Dey N, Hyland JM, Hurt JJ, Heddleston KL. An epornitic of avian cholera in waterfowl and common crows in Phelps County, Nebraska, in the spring, 1975. *J Wildl Dis* 1977;13:194-8.
234. Zunino CH, Castrelos OD, Margni RA *Microbiología Antártica*. IV. Aportes para su mejor comprensión en Puerto Paraíso. Contribución del I.A.A. N° 307. 1985.
235. Zuydam DM. Penicilline als therapeuticum bij vogelcholera. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde* 1952;77:256-7.



**Tabla 1.** Identificación de las subespecies de *Pasteurella multocida* según Koneman et al. (1999)

Propiedades bioquímicas	Subespecie		
	<i>multocida</i>	<i>septica</i>	<i>gallicida</i>
Hemólisis	-	-	-
Oxidasa	+	+	+
Catalasa	+	+	+
Crecimiento en agar MacConkey	-	-	-
Producción de indol	+	+	+
Reducción de nitrato	+	+	+
Ureasa	-	-	-
Ornitina decarboxilasa	+	+	+
Fermentación de glucosa	+	+	+
Fermentación de maltosa	-	-	-
Fermentación de lactosa	v	-	-
Fermentación de galactosa	+	+	+
Fermentación de xilosa	v	+	+
Fermentación de manitol	+	+	+
Fermentación de trehalosa	v	+	-
Fermentación de arabinosa	-	-	v
Fermentación de sorbitol	+	-	+
Fermentación de dulcitol	-	-	+

+: positivo, -: negativo, v: variable

**Tabla 2.** Cuerpos de agua dulce analizados durante los años 2001, 2002 y 2003 en Bahía Esperanza.

Cuerpo de agua dulce	Aporte orgánico de la colonia de pingüinos Adelia	Presencia de aves voladoras*	Distancia del mar (m)	Tamaño (m)	Aves halladas muertas en torno al cuerpo de agua dulce
<b>1</b>	Si	Si (2001)	30	2 x 1,5	51 pingüinos, 3 gaviotas, 23 skuas (2001)
<b>2</b>	Si	Si (2001)	30	4 x 2	51 pingüinos, 3 gaviotas, 23 skuas (2001)
<b>3</b>	No	No	100	30 x 20	-
<b>4</b>	Si	Si (2000)	100	10 x 10	13 skuas, 2 gaviotas (2000)
<b>5</b>	No	No	300	200 x 100	-
<b>6</b>	Si	Si (1997)	600	30 x 20	23 skuas (1997)
<b>7</b>	Si	No	<b>40</b>	4 x 2	-
<b>8</b>	Si	Si (1981 y 1990)	900	300 x 150	12 skuas (1981) 38 skuas (1990)
<b>9</b>	Si	No	70	10 x 8	-
<b>10</b>	Si	No	400	50 x 50	-
<b>11</b>	Si	No	100	7 x 7	-
<b>12</b>	Si	No	150	5 x 5	-

\* Durante los veranos 2001-2002 y 2002-2003 las aves voladoras se agruparon en torno a chorrillos de deshielo

**Tabla 3.** Identificación de los biotipos de *Pasteurella multocida* según Fegan et al. (1995).

Propiedades bioquímicas	Biotipos									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>ODC</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Fermentación de <b>arabinosa</b>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Fermentación de <b>dulcitol</b>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Fermentación de <b>maltosa</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Fermentación de <b>sorbitol</b>	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-
Fermentación de <b>trehalosa</b>	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+
Fermentación de <b>xilosa</b>	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+
subespecie	<i>m</i>	<i>m</i>	<i>m</i>	<i>m</i>	?	?	<i>s</i>	<i>g</i>	<i>m</i>	<i>s</i>

**ODC:** ornitina decarboxilasa, +: positivo, -: negativo, *m*: *P. m. multocida*, *s*: *P. m. septica*, *g*: *P. m. gallicida*, ?: desconocido

**Tabla 4.** Secuencia de los oligonucleótidos utilizados en la técnica de PCR múltiple para determinar el tipo capsular de *Pasteurella multocida*.

Tipo capsular	gen	nombre	Secuencia (5'-3')	Amplicón (bp)	Posición en el genoma
Todos	KMT1	KMT1T7	ATCCGCTATTTACCCAGTGG	460	
		KMT1SP6	GCTGTAAACGAACTCGCCAC		
A	<i>hyaD-hyaC</i>	CAPA-FWD	TGCCAAAATCGCAGTCAG	1044	8846-8863
		CAPA-REV	TTGCCATCATTGTCAGTG		9890-9873
B	<i>bcbD</i>	CAPB-FWD	CATTTATCCAAGCTCCACC	760	13621-13603
		CAPB-REV	GCCCGAGAGTTTCAATCC		12863-12880
D	<i>dcbF</i>	CAPD-FWD	TTACAAAAGAAAGACTAGGAGCCC	657	3142-3165
		CAPD-REV	CATCTACCCACTCAACCATATCAG		3789-3766
E	<i>ecbJ</i>	CAPE-FWD	TCCGCAGAAAATTATTGACTC	511	4387-4408
		CAPE-REV	GCTTGCTGCTTGATTTTGTC		4899-4881
F	<i>fcbD</i>	CAPF-FWD	AATCGGAGAAACGCAGAAATCAG	851	2881-2896
		CAPF-REV	TTCCGCCGTCAATTA CTCTG		3733-3714

**Tabla 5.** Antimicrobianos utilizados para determinar la susceptibilidad de las cepas de *Pasteurella multocida*.

<b>Antimicrobiano</b>	<b>Potencia (%)</b>	<b>Pesada (gr)</b>	<b>Solvente (1 ml)</b>	<b>Diluyente (9 ml)</b>	<b>Rango <math>\mu\text{g} / \text{ml}</math></b>	<b>Punto de corte</b>
<b>Ampicilina</b>	93,5	10,7	Buffer Fosfato pH 8	Buffer Fosfato pH 6	0,5 – 64	$\leq 8$ (S) 16 (I) $\geq 32$ (R)
<b>Cefalotina</b>	93,5	10,7	Buffer Fosfato pH 6	Agua Destilada	0,5 – 64	$\leq 8$ (S) 16 (I) $\geq 32$ (R)
<b>Estreptomicina</b>	71,8	13,9	Agua Destilada	Agua Destilada	1 – 128	$\leq 32$ (S) $\geq 32$ (R)
<b>Gentamicina</b>	63,1	15,9	Agua Destilada	Agua Destilada	1 – 128	$\leq 4$ (S) 8 (I) $\geq 16$ (R)
<b>Ceftiofur</b>	96,8	10,3	Agua Destilada	Agua Destilada	0,25 – 32	$\leq 2$ (S) 4 (I) $\geq 8$ (R)
<b>Enrofloxacin</b>	96,5	10,4	AD + NaOH	Agua Destilada	0,06 – 8	$\leq 0,25$ (S) 0,5/1 (I) $\geq 2$ (R)
<b>Tetraciclina</b>	98	10,2	Agua Destilada	Agua Destilada	0,5 – 64	$\leq 8$ (S) 16 (I) $\geq 32$ (R)
<b>Tilosina</b>	93,45	10,7	Etanol	Agua Destilada	2 – 256	-
<b>Aivlosin</b>	83	12	Agua Destilada	Agua Destilada	4 – 512	-
<b>Tiamulina</b>	100	10	Etanol	Agua Destilada	2 – 256	$\leq 16$ (S) $\geq 32$ (R)
<b>Florfenicol</b>	99,6	10	Etanol	Agua Destilada	0,5 – 64	$\leq 2$ (S) 4 (I) $\geq 8$ (R)

**Tabla 6.** Cepas de *Pasteurella multocida* de diferente origen.

<b>Identificación</b>	<b>Origen</b>	<b>Año</b>
SK P 2000	Skua	Bahía Esperanza 2000
SK P 2000	Skua	Bahía Esperanza 2000
Petrel	Petrel gigante del sur	Shetland del Sur 2000
S1	Pollo	NADC X-73 -
S2	Bisonte	NADC M-1404 -
S3	Pavo	NADC P-1059 -
S4	Pavo	NADC P-1662 -
S5	Pavo	NADC P-1702 -
S6	Pollo	NADC P-2192 -
S7	Gaviota	NADC P-1997 -
S8	Puercoespín	NADC P-1581 -
S9	Pavo	NADC P-2095 -
S10	Pavo	NADC P-2100 -
S11	Cerdo	NADC P-903 -
S12	Humano	NADC P-1573 -
S13	Humano	NADC P-1591 -
S14	Bovino	NADC P-2225 -
S15	Pavo	NADC P-2237 -
S16	Pavo	NADC P-2723 -
ATCC	Bovino	ATCC 51689 -
001	Gallina	Gran Bs As 2000
002	Gallina	INTA 1159 -
004	Gallina	S M del Monte 1998
005	Gallina	Zarate 1999
006	Gallina	Rosario 1995
009	Gallina	Entre Ríos 1998
010	Gallina	Colón Bs As 1997
011	Gallina	Zarate 1983
013	Gallina	S M del Monte 1985
003	Gallina	Uruguay 2001
B-82	Gallina	Australia -
C 1	Cerdo	Zarate 2000
C 2	Cerdo	Brandsen 2000
C 3	Cerdo	Pipinas 2000
C 4	Cerdo	La Plata 2002
C 5	Cerdo	- -
C 6	Cerdo	Pipinas 2000
C 7	Cerdo	La Plata 2002
C 8	Cerdo	Bavio -
C 9	Cerdo	S A de Areco 2000
C 10	Cerdo	Roque Perez 2002

**Tabla 7.** Características físicas, químicas, organolépticas y aislamiento de *Pasteurella multocida* de los cuerpos de agua dulce de Bahía Esperanza durante el verano 2000-2001.

Cuerpo de agua	pH	Salinidad (g/l)	Temperatura (°C)	Turbidez	Características organolépticas	<i>Pasteurella multocida</i>	Asentamiento de aves
1	7	8,73	5	++	inolora / incolora	+	si
2	7	8,87	3	++	inolora / incolora	-	si
3	6	0,55	3	-	inolora / incolora	-	no
4	6	0,64	3	-	inolora / incolora	-	no
5	6	0,05	1	-	inolora / incolora	-	no
6	7	1,98	1,5	++++	olor a materia fecal color verde	-	no
7	7	3,86	1	++++	olor a materia fecal color naranja	-	no
8	6	0,09	1	+	inolora / incolora	-	no
9	8	3,67	1	++++	olor a materia fecal color naranja	-	no
10	6	1,94	1	++	inolora / incolora	-	no

-: translúcida, +: moderadamente turbia, ++: turbia, +++: muy turbia, ++++: excesivamente turbia

**Tabla 8.** Características físicas, químicas, organolépticas de los cuerpos de agua dulce de Bahía Esperanza durante el verano 2001-2002.

Cuerpo de agua	pH	Salinidad (g/l)	Temperatura (°C)	Turbidez	características organolépticas	Asentamiento de aves
1	7	6,32	3	++	inolora / incolora	no
2	7	5,97	3	++	inolora / incolora	no
3	6	0,45	3	-	inolora / incolora	no
4	6	0,73	3	-	inolora / incolora	no
5	6	0,05	1	-	inolora / incolora	no
6	7	2,43	5	+++	olor a materia fecal color marrón	no
7	7	2,93	7	++++	olor a materia fecal color naranja	no
8	6	0,17	1	-	inolora / incolora	no
9	7	3,15	7	++++	olor a materia fecal color naranja	no
10	6	2,35	5	++	Inolora / incolora	no

-: translúcida, +: moderadamente turbia, ++: turbia, +++: muy turbia, ++++: excesivamente turbia



**Tabla 9.** Características físicas, químicas, organolépticas y aislamiento de *Pasteurella multocida* de los cuerpos de agua dulce de Bahía Esperanza durante el verano 2002-2003.

<b>Cuerpo de agua</b>	<b>pH</b>	<b>Salinidad (g/l)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Turbidez</b>	<b>características organolépticas</b>	<b><i>Pasteurella multocida</i></b>	<b>Asentamiento de aves</b>
<b>3</b>	6	0,37	5	-	inolora / inolora	-	no
<b>4</b>	6	0,39	5	-	inolora / inolora	-	no
<b>5</b>	6	0,08	2	-	inolora / inolora	-	no
<b>6</b>	7	3,85	5	+++	olor a materia fecal color marrón	-	no
<b>7</b>	6,5	2,88	0,5	++++	olor a materia fecal color naranja	-	no
<b>8</b>	6	0,14	1	+	Inolora / inolora	-	no
<b>9</b>	6,5	3,67	2	++++	olor a materia fecal color naranja	-	no
<b>10</b>	6	2,58	5	++	inolora / inolora	-	no
<b>11</b>	7	7,32	1	+	inolora / inolora	-	no
<b>12</b>	7,5	6,26	1	+	inolora / inolora	-	no

-: translúcida, +: moderadamente turbia, ++: turbia, +++: muy turbia, ++++: excesivamente turbia

**Tabla 10a.** Datos climáticos del mes de enero del año 2001 en Bahía Esperanza.

día	Temperatura ambiental (°C)			Precipitaciones		Viento (km/h)
	Máxima	Mínima	Promedio	Lluvia (mm)	Nieve (cm)	
<b>1</b>	0,1	-4,0	-2,0	0,0	0,0	44
<b>2</b>	3,4	-3,8	-0,2	0,0	0,0	47
<b>3</b>	1,4	-2,6	-0,6	1,4	0,0	40
<b>4</b>	2,2	-1,0	-0,6	3,1	2,0	27
<b>5</b>	3,1	-3,2	-0,1	0,0	0,0	27
<b>6</b>	3,8	-3,0	0,4	0,0	0,0	27
<b>7</b>	5,9	-0,6	2,7	0,0	0,0	28
<b>8</b>	5,8	1,1	3,5	0,0	0,0	37
<b>9</b>	2,4	-2,0	0,2	0,0	0,0	16
<b>10</b>	1,7	-2,0	-0,3	1,8	0,0	24
<b>11</b>	3,3	-0,8	1,3	0,0	0,0	20
<b>12</b>	4,4	0,0	2,2	0,0	0,0	34
<b>13</b>	4,5	-0,6	2,0	0,0	0,0	37
<b>14</b>	4,2	-1,2	1,5	0,2	3,0	40
<b>15</b>	4,7	-0,5	2,1	9,3	3,0	23
<b>16</b>	2,1	-1,0	0,6	0,0	0,0	60
<b>17</b>	4,3	-1,6	1,4	0,0	0,0	60
<b>18</b>	4,8	-0,1	2,4	0,1	0,0	60
<b>19</b>	4,8	0,4	2,6	0,0	0,0	80
<b>20</b>	3,4	0,3	1,9	0,6	0,0	38
<b>21</b>	3,5	-1,0	1,3	0,0	0,0	58
<b>22</b>	2,8	-1,1	0,9	15,5	0,0	12
<b>23</b>	3,6	-1,0	1,3	2,4	13,0	33
<b>24</b>	5,1	-1,2	2,0	1,2	0,0	8
<b>25</b>	3,8	-1,1	1,9	0,0	0,0	30
<b>26</b>	3,2	-2,2	0,5	0,2	0,6	24
<b>27</b>	1,3	-1,6	-0,2	0,1	0,0	34
<b>28</b>	1,4	-1,7	-0,2	4,7	0,0	32
<b>29</b>	2,5	-1,6	0,5	0,0	8,0	66
<b>30</b>	-2,7	-4,0	-3,4	2,5	2,0	80
<b>31</b>	-1,0	-4,0	-2,5	0,0	0,0	62

**Tabla 10b.** Datos climáticos del mes de febrero del año 2001 en Bahía Esperanza.

día	Temperatura ambiental (°C)			Precipitaciones		Viento (km/h)
	Máxima	Mínima	promedio	Lluvia (mm)	Nieve (cm)	
<b>1</b>	3,2	-3,6	-0,2	0,0	0,0	31
<b>2</b>	3,3	-1,6	0,9	0,2	0,0	40
<b>3</b>	-0,5	-2,7	-1,6	0,2	0,0	98
<b>4</b>	-0,9	-3,2	-2,1	1,4	0,0	98
<b>5</b>	-0,4	-3,5	-2,0	1,3	1,0	100
<b>6</b>	-2,8	-4,3	-3,6	0,5	3,0	82
<b>7</b>	0,2	-3,0	-1,4	0,0	2,0	24
<b>8</b>	0,9	-2,7	-0,9	12,4	12,0	12
<b>9</b>	2,3	-2,1	0,1	1,7	9,0	24
<b>10</b>	-2,1	-4,2	-3,2	0,0	0,0	100
<b>11</b>	-3,2	-5,3	-4,3	0,0	0,0	130
<b>12</b>	-0,8	-4,7	-2,8	0,0	0,0	110
<b>13</b>	4,0	-1,3	1,4	0,0	0,0	40
<b>14</b>	4,8	0,1	2,5	0,3	0,0	46
<b>15</b>	2,7	-1,5	0,6	0,0	0,0	12
<b>16</b>	2,3	-2,0	0,2	0,0	0,0	24
<b>17</b>	-0,2	-5,0	-2,6	0,0	0,0	100
<b>18</b>	0,7	-3,8	-1,6	0,0	0,0	60
<b>19</b>	-0,2	-4,1	-2,2	0,0	0,0	60
<b>20</b>	-1,0	-4,5	-2,8	0,0	0,0	40
<b>21</b>	-1,3	-4,0	-2,7	0,0	0,0	40
<b>22</b>	-3,7	-6,8	-5,3	0,0	0,0	40
<b>23</b>	-3,0	-7,1	-5,1	0,0	0,0	32
<b>24</b>	2,1	-5,2	-1,6	0,0	0,0	6
<b>25</b>	7,0	-3,1	2,0	1,0	0,0	42
<b>26</b>	2,7	0,0	1,4	2,5	0,0	24
<b>27</b>	2,1	-1,7	0,2	0,0	0,0	48
<b>28</b>	0,6	-5,0	-2,2	0,0	0,0	41

**Tabla 11a.** Datos climáticos del mes de enero del año 2002 en Bahía Esperanza.

día	Temperatura ambiental (°C)			Precipitaciones		Viento (km/h)
	Máxima	Mínima	promedio	Lluvia (mm)	Nieve (cm)	
1	3,9	1,0	2,5	11,8	0,0	42
2	3,1	-1,2	1,0	0,0	0,0	12
3	2,2	-1,6	0,6	5,5	0,0	55
4	3,4	-0,4	1,5	0,6	0,0	42
5	3,5	0,2	1,9	0,8	0,0	16
6	2,8	-1,8	0,5	0,0	0,0	33
7	2,1	-1,0	0,6	2,5	0,0	50
8	2,4	-1,2	0,6	0,0	3,0	107
9	1,5	-0,6	0,5	0,0	0,0	33
10	1,8	-1,4	0,2	0,0	0,0	74
11	2,5	-1,7	1,7	0,0	0,0	107
12	3,0	-1,2	0,9	2,2	0,0	39
13	2,9	-0,8	1,1	0,7	0,0	16
14	3,2	-0,4	1,4	0,5	0,0	118
15	2,4	0,2	1,3	0,0	0,0	105
16	3,4	0,5	2,0	0,3	0,0	37
17	4,5	0,7	2,6	0,0	0,0	74
18	3,8	-0,2	1,8	0,0	0,0	66
19	1,8	0,2	1,0	0,0	0,0	74
20	2,0	-0,1	1,0	1,5	0,0	92
21	2,5	-1,0	0,8	0,0	0,0	74
22	1,8	-1,2	0,3	0,0	0,0	118
23	3,5	-2,1	0,7	0,0	0,0	33
24	2,7	-0,5	1,1	9,8	0,0	55
25	0,0	-2,6	-1,3	1,1	3,0	72
26	2,2	-2,0	0,1	0,2	0,0	74
27	1,1	-0,5	0,3	0,0	0,0	20
28	3,2	-0,8	1,2	0,0	0,0	55
29	3,0	0,8	1,9	0,0	0,0	20
30	2,8	-0,2	1,3	0,0	0,0	20
31	0,6	-2,9	-1,2	0,0	0,0	24

**Tabla 11b.** Datos climáticos del mes de febrero del año 2002 en Bahía Esperanza.

día	Temperatura ambiental (°C)			Precipitaciones		Viento (km/h)
	Máxima	Mínima	promedio	Lluvia (mm)	Nieve (cm)	
<b>1</b>	2,2	-0,8	0,7	18,8	0,0	22
<b>2</b>	2,3	-1,5	0,4	0,0	0,0	20
<b>3</b>	3,5	0,1	1,8	0,0	0,0	40
<b>4</b>	3,0	0,0	1,5	0,0	0,0	68
<b>5</b>	1,9	-4,2	-1,2	3,0	0,1	74
<b>6</b>	3,2	-1,0	1,1	0,0	0,0	40
<b>7</b>	3,2	-1,4	0,9	0,0	0,0	55
<b>8</b>	3,9	0,3	2,1	0,0	0,0	107
<b>9</b>	3,8	-0,2	1,8	0,0	0,0	109
<b>10</b>	2,9	0,1	1,5	0,0	0,0	68
<b>11</b>	4,0	0,0	2,0	0,0	0,0	74
<b>12</b>	4,2	0,0	2,1	5,0	3,0	110
<b>13</b>	4,5	-0,6	2,0	4,0	3,0	78
<b>14</b>	4,0	-1,0	1,5	0,0	0,0	100
<b>15</b>	4,2	-0,5	1,9	0,0	0,0	133
<b>16</b>	2,7	-1,2	0,8	0,0	0,0	46
<b>17</b>	4,5	-1,3	1,6	0,0	0,0	100
<b>18</b>	4,4	-0,2	2,1	5,0	0,0	48
<b>19</b>	4,1	0,3	2,2	2,0	8,0	79
<b>20</b>	3,0	0,3	1,7	0,0	0,0	63
<b>21</b>	3,2	-1,2	1,0	0,0	0,0	92
<b>22</b>	2,5	-1,0	0,8	2,0	0,0	41
<b>23</b>	3,8	-1,0	1,4	1,0	0,0	70
<b>24</b>	4,5	-1,1	1,7	0,0	0,0	61
<b>25</b>	3,2	-1,2	1,0	0,0	0,0	96
<b>26</b>	3,0	-2,0	0,5	0,0	0,0	80
<b>27</b>	1,3	-1,0	0,2	0,0	0,0	40
<b>28</b>	1,2	-1,5	-0,2	0,0	0,0	48

**Tabla 12a.** Datos climáticos del mes de enero del año 2003 en Bahía Esperanza.

día	Temperatura ambiental (°C)			Precipitaciones		Viento (km/h)
	Máxima	Mínima	promedio	Lluvia (mm)	Nieve (cm)	
1	9,9	1,0	5,3	0,0	0,0	37
2	6,1	-1,6	2,1	0,0	0,0	41
3	4,2	0,2	1,9	0,0	0,0	18
4	4,4	2,4	1,7	2,0	0,0	44
5	5,5	0,2	2,0	0,0	0,0	41
6	2,2	-1,5	0,3	0,0	0,0	18
7	2,6	-0,8	0,5	7,0	3,0	22
8	1,6	-1,5	-0,4	4,0	1,5	74
9	0,5	-1,6	-0,7	3,5	3,5	59
10	0,8	-1,6	0,4	0,0	0,0	70
11	3,5	-0,7	-1,0	5,0	0,1	18
12	3,6	-0,8	1,4	0,0	0,0	33
13	2,8	0,4	1,4	0,0	0,0	6
14	4,2	0,4	1,6	0,0	0,0	15
15	1,2	0,0	1,5	0,0	0,0	11
16	4,2	0,4	1,4	0,0	0,0	33
17	5,5	-0,7	2,3	0,0	0,0	18
18	4,0	-0,8	1,3	0,0	0,0	37
19	2,0	0,0	0,5	0,0	0,0	37
20	1,8	-0,2	0,5	0,0	0,0	33
21	2,8	-1,1	0,6	0,0	0,0	37
22	1,0	-0,6	-0,2	0,0	0,0	33
23	4,4	-2,4	1,4	0,0	0,0	22
24	4,7	-0,5	2,4	0,0	0,0	18
25	0,2	-1,2	-0,4	0,0	0,0	28
26	1,6	-2,4	-0,3	1,0	3,0	22
27	0,1	-0,8	-0,3	6,0	9,0	18
28	2,0	-0,6	0,5	0,0	0,0	18
29	1,2	0,0	0,4	2,0	5,0	17
30	1,4	-0,8	-0,2	2,0	4,0	15
31	1,6	-0,9	-0,1	0,0	0,0	18

**Tabla 12b.** Datos climáticos del mes de febrero del año 2003 en Bahía Esperanza.

día	Temperatura ambiental (°C)			Precipitaciones		Viento (km/h)
	Máxima	Mínima	promedio	Lluvia (mm)	Nieve (cm)	
<b>1</b>	4,8	-0,4	1,0	0,0	0,0	18
<b>2</b>	0,3	-3,7	-1,9	0,0	0,0	11
<b>3</b>	5,0	2,2	1,6	3,0	0,4	44
<b>4</b>	2,3	0,1	0,3	0,0	0,0	59
<b>5</b>	1,4	-1,0	0,2	2,0	0,1	65
<b>6</b>	2,3	-2,3	-0,3	0,0	0,0	22
<b>7</b>	5,0	-0,7	2,3	2,0	0,0	48
<b>8</b>	2,7	0,2	1,1	1,0	0,0	46
<b>9</b>	1,6	-1,0	-0,2	0,0	0,0	63
<b>10</b>	2,3	-2,2	0,3	3,0	0,0	37
<b>11</b>	4,4	-0,8	1,8	3,5	0,0	22
<b>12</b>	2,0	-1,1	-0,1	3,0	0,1	28
<b>13</b>	0,8	-2,4	-0,8	1,0	0,0	59
<b>14</b>	2,7	-1,5	0,4	0,0	0,0	65
<b>15</b>	5,2	1,4	2,7	1,0	0,1	107
<b>16</b>	6,7	3,3	4,6	0,0	0,0	70
<b>17</b>	4,0	-0,2	2,3	0,0	0,0	18
<b>18</b>	2,2	0,4	0,8	1,0	0,1	18
<b>19</b>	8,4	0,2	3,8	0,0	0,0	44
<b>20</b>	9,8	0,6	3,9	1,0	0,2	95
<b>21</b>	6,0	1,6	3,2	0,0	0,0	66
<b>22</b>	6,0	0,9	2,8	0,0	0,0	33
<b>23</b>	7,0	1,3	3,2	0,0	0,0	41
<b>24</b>	7,8	3,8	4,9	0,0	0,0	33
<b>25</b>	3,8	-1,8	-0,7	9,0	9,0	44
<b>26</b>	-1,6	-3,2	-2,5	0,0	0,0	78
<b>27</b>	-2,7	-3,8	-3,0	4,0	0,3	33
<b>28</b>	-2,0	-3,9	-2,8	0,0	0,0	70

**Tabla 13a.** Aves halladas muertas o moribundas entre noviembre del año 2000 y febrero del año 2001.

Especie	Estado	Edad	Sexo	Causa de la muerte	Lugar del hallazgo	Fecha
gaviota cocinera	muerto	AR	♂	cambios posmortem	Colonia de pingüino Adelia	10/11/2000
paloma antártica	muerto	AR	(-)	cambios posmortem	Lago Boeckella	11/11/2000
pingüino Adelia	muerto	AR	♀	prolapso cloacal	Colonia de pingüino Adelia	12/11/2000
pingüino Adelia	muerto	AR	♂	Dermatitis Gangrenosa	Colonia de pingüino Adelia	13/11/2000
gaviota cocinera	muerto	Nr	♂	cambios posmortem	Cuerpo de agua N° 6	15/11/2000
pingüino Adelia	muerto	AR	♂	sin lesiones	Península Esperanza	23/11/2000
gaviota cocinera	muerto	Nr	♂	tumor interdigital	Faro	14/12/2000
pingüino Adelia	muerto	AR	♂	luxación FTR	Cuerpo de agua N° 6	20/12/2000
pingüino Adelia	muerto	AR	♀	sin lesiones	Centro de la pingüinera	25/12/2000
gaviota cocinera	muerto	AR	♀	Cólera Aviar crónico	Cuerpos de agua N° 1 y 2	10/01/2001
pingüino Adelia	muerto	AR	♀	Dermatitis Gangrenosa	Península Esperanza	12/01/2001
skua	moribundo	AR	♀	Cólera Aviar subagudo	Cuerpos de agua N° 1 y 2	17/01/2001
skua	moribundo	AR	♀	Cólera Aviar subagudo	Cuerpos de agua N° 1 y 2	17/01/2001
skua	muerto	AR	♀	Cólera Aviar subagudo	Cuerpos de agua N° 1 y 2	17/01/2001
skua	muerto	AR	♀	Cólera Aviar subagudo	Cuerpos de agua N° 1 y 2	17/01/2001
skua	muerto	AR	♂	Cólera Aviar subagudo	Cuerpos de agua N° 1 y 2	18/01/2001
skua	muerto	AR	♂	Cólera Aviar subagudo	Cuerpos de agua N° 1 y 2	18/01/2001
skua	moribundo	AR	♀	Cólera Aviar subagudo	Cuerpos de agua N° 1 y 2	20/01/2001
skua	muerto	AR	♀	Cólera Aviar subagudo	Cuerpos de agua N° 1 y 2	22/01/2001
pingüino Adelia	muerto	AR	♀	Cólera Aviar agudo	Cuerpos de agua N° 1 y 2	22/01/2001
pingüino Adelia	muerto	AR	♂	Cólera Aviar agudo	Cuerpos de agua N° 1 y 2	22/01/2001
pingüino Adelia	muerto	AR	♀	Cólera Aviar agudo	Cuerpos de agua N° 1 y 2	22/01/2001
skua	moribundo	AR	♀	Cólera Aviar subagudo	Cuerpos de agua N° 1 y 2	23/01/2001
pingüino Adelia	muerto	AR	♀	Cólera Aviar agudo	Cuerpos de agua N° 1 y 2	23/01/2001
pingüino Adelia	muerto	AR	♂	Cólera Aviar agudo	Cuerpos de agua N° 1 y 2	23/01/2001
skua	muerto	AR	♀	Cólera Aviar subagudo	Cuerpos de agua N° 1 y 2	25/01/2001
skua	moribundo	AR	♀	Cólera Aviar subagudo	Cuerpos de agua N° 1 y 2	25/01/2001
skua	muerto	AR	♀	Cólera Aviar subagudo	Cuerpos de agua N° 1 y 2	26/01/2001
skua	moribundo	AR	♀	Cólera Aviar subagudo	Cuerpos de agua N° 1 y 2	26/01/2001
pingüino Adelia	muerto	AR	♂	Cólera Aviar agudo	Cuerpos de agua N° 1 y 2	26/01/2001
skua	muerto	AR	♂	Cólera Aviar subagudo	Cuerpos de agua N° 1 y 2	28/01/2001
skua	muerto	AR	♀	Cólera Aviar subagudo	Cuerpos de agua N° 1 y 2	28/01/2001
skua	muerto	AR	♀	Cólera Aviar subagudo	Cuerpos de agua N° 1 y 2	28/01/2001
skua	muerto	AR	♂	Cólera Aviar subagudo	Cuerpos de agua N° 1 y 2	28/01/2001
pingüino Adelia	muerto	P	♂	Cólera Aviar agudo	Cuerpos de agua N° 1 y 2	28/01/2001
pingüino Adelia	muerto	AR	♀	Cólera Aviar agudo	Cuerpos de agua N° 1 y 2	28/01/2001
pingüino Adelia	muerto	AR	♀	Cólera Aviar agudo	Cuerpos de agua N° 1 y 2	28/01/2001
pingüino Adelia	muerto	AR	♂	Cólera Aviar agudo	Cuerpos de agua N° 1 y 2	28/01/2001
pingüino Adelia	muerto	AR	♀	Cólera Aviar agudo	Cuerpos de agua N° 1 y 2	28/01/2001
pingüino Adelia	muerto	AR	♂	Cólera Aviar agudo	Cuerpos de agua N° 1 y 2	28/01/2001
pingüino Adelia	muerto	AR	♂	Cólera Aviar agudo	Cuerpos de agua N° 1 y 2	28/01/2001
pingüino Adelia	muerto	AR	♂	Cólera Aviar agudo	Cuerpos de agua N° 1 y 2	28/01/2001
pingüino Adelia	muerto	AR	♀	Cólera Aviar agudo	Cuerpos de agua N° 1 y 2	28/01/2001

♂: macho, ♀: hembra, AR: adulto reproductivo, Nr: adulto no reproductivo, Pi: pichón. FTR: femoro-tibio-rotuliana.



**Tabla 13b.** Aves halladas muertas o moribundas entre noviembre del año 2000 y febrero del año 2001.

<b>Nombre vulgar</b>	<b>Estado</b>	<b>Edad</b>	<b>Sexo</b>	<b>Causa de la muerte</b>	<b>Lugar del hallazgo</b>	<b>Fecha</b>
pingüino Adelia	muerto	AR	♂	Cólera Aviar agudo	Cuerpos de agua N° 1 y 2	28/01/2001
pingüino Adelia	muerto	AR	♂	Cólera Aviar agudo	Cuerpos de agua N° 1 y 2	28/01/2001
pingüino Adelia	muerto	AR	♀	Cólera Aviar agudo	Cuerpos de agua N° 1 y 2	28/01/2001
pingüino Adelia	muerto	AR	♀	Cólera Aviar agudo	Cuerpos de agua N° 1 y 2	28/01/2001
pingüino Adelia	muerto	AR	♂	Cólera Aviar agudo	Cuerpos de agua N° 1 y 2	28/01/2001
pingüino Adelia	muerto	AR	♂	Cólera Aviar agudo	Cuerpos de agua N° 1 y 2	28/01/2001
pingüino Adelia	muerto	AR	♀	Cólera Aviar agudo	Cuerpos de agua N° 1 y 2	29/01/2001
pingüino Adelia	moribundo	AR	♂	Cólera Aviar agudo	Cuerpos de agua N° 1 y 2	30/01/2001
pingüino Adelia	moribundo	AR	♂	Cólera Aviar agudo	Cuerpos de agua N° 1 y 2	30/01/2001
pingüino Adelia	moribundo	AR	♀	Cólera Aviar agudo	Cuerpos de agua N° 1 y 2	30/01/2001
pingüino Adelia	moribundo	AR	♂	Cólera Aviar agudo	Cuerpos de agua N° 1 y 2	30/01/2001
pingüino Adelia	moribundo	AR	♀	Cólera Aviar agudo	Cuerpos de agua N° 1 y 2	30/01/2001
pingüino Adelia	moribundo	AR	♂	Cólera Aviar agudo	Cuerpos de agua N° 1 y 2	30/01/2001
pingüino Adelia	moribundo	AR	♂	Cólera Aviar agudo	Cuerpos de agua N° 1 y 2	30/01/2001
pingüino Adelia	moribundo	AR	♀	Cólera Aviar agudo	Cuerpos de agua N° 1 y 2	30/01/2001
gaviota cocinera	muerto	Nr	♂	Cólera Aviar crónico	Caleta Aguila	31/01/2001
pingüino Adelia	muerto	AR	♂	Cólera Aviar agudo	Cuerpos de agua N° 1 y 2	31/01/2001
pingüino Adelia	muerto	AR	♂	Cólera Aviar agudo	Cuerpos de agua N° 1 y 2	31/01/2001
pingüino Adelia	muerto	Pi	♂	Cólera Aviar agudo	Cuerpos de agua N° 1 y 2	31/01/2001
pingüino Adelia	muerto	Pi	♀	Cólera Aviar agudo	Cuerpos de agua N° 1 y 2	31/01/2001
pingüino Adelia	muerto	AR	♂	Cólera Aviar agudo	Cuerpos de agua N° 1 y 2	31/01/2001
pingüino Adelia	muerto	Pi	♀	Cólera Aviar agudo	Cuerpos de agua N° 1 y 2	31/01/2001
skua	muerto	AR	♂	Cólera Aviar subagudo	Cuerpos de agua N° 1 y 2	31/01/2001
skua	muerto	AR	♂	Cólera Aviar subagudo	Cuerpos de agua N° 1 y 2	31/01/2001
pingüino Adelia	muerto	AR	♂	Cólera Aviar agudo	Cuerpos de agua N° 1 y 2	01/02/2001
pingüino Adelia	muerto	AR	♂	Cólera Aviar agudo	Cuerpos de agua N° 1 y 2	01/02/2001
pingüino Adelia	muerto	AR	♀	Cólera Aviar agudo	Cuerpos de agua N° 1 y 2	02/02/2001
pingüino Adelia	muerto	AR	♀	Cólera Aviar agudo	Cuerpos de agua N° 1 y 2	02/02/2001
pingüino Adelia	muerto	AR	♀	Cólera Aviar agudo	Cuerpos de agua N° 1 y 2	02/02/2001
pingüino Adelia	muerto	AR	♀	Cólera Aviar agudo	Cuerpos de agua N° 1 y 2	02/02/2001
pingüino Adelia	muerto	AR	♀	Cólera Aviar agudo	Cuerpos de agua N° 1 y 2	02/02/2001
pingüino Adelia	muerto	AR	♀	Cólera Aviar agudo	Cuerpos de agua N° 1 y 2	02/02/2001
pingüino Adelia	muerto	AR	♀	Cólera Aviar agudo	Cuerpos de agua N° 1 y 2	02/02/2001
pingüino Adelia	muerto	Pi	♂	Cólera Aviar agudo	Cuerpos de agua N° 1 y 2	06/02/2001
gaviota cocinera	muerto	AR	♀	tumor interdigital	Península Esperanza	07/02/2001
pingüino papua	muerto	AR	♀	sin lesiones	Colonia de pingüino papua	13/02/2001
skua	muerto	AR	♂	Cólera Aviar subagudo	Cuerpos de agua N° 1 y 2	14/02/2001
skua	muerto	AR	♀	Cólera Aviar subagudo	Península Esperanza	18/02/2001
skua	muerto	AR	♀	Cólera Aviar subagudo	Caleta Aguila	19/02/2001
skua	muerto	AR	♀	Cólera Aviar subagudo	Cuerpos de agua N° 1 y 2	20/02/2001

♂: macho, ♀: hembra, AR: adulto reproductivo, Nr: adulto no reproductivo, Pi: pichón.

**Tabla 14.** Aves halladas muertas entre noviembre del año 2001 y febrero del año 2002.

Especie	Estado	Edad	Sexo	Causa de la muerte	Lugar del hallazgo	Fecha
skua	muerto	AR	♀	fractura expuesta de radio y cubito	Colonia de pingüino Adelia	15/11/2001
gaviota cocinera	muerto	AR	♂	sin lesiones	Colonia de pingüino Adelia	28/11/2001
pingüino Adelia	muerto	AR	♀	sin lesiones	Colonia de pingüino Adelia	19/12/2001
skua	muerto	Pi	♂	sin lesiones	Colonia de pingüino Adelia	30/12/2001
gaviota cocinera	muerto	AR	♀	sin lesiones	Colonia de pingüino Adelia	09/01/2002
skua	muerto	AR	♂	evidentes cambios posmortem	Colonia de pingüino Adelia	25/01/2002
skua	muerto	AR	♂	sin lesiones	Colonia de pingüino Adelia	27/01/2002
pingüino Adelia	muerto	AR	♂	sin lesiones	Colonia de pingüino Adelia	10/02/2002
skua	muerto	AR	♂	sin lesiones	Colonia de pingüino Adelia	14/02/2002
gaviota cocinera	muerto	AR	♂	sin lesiones	Colonia de pingüino Adelia	19/02/2002

♂: macho, ♀: hembra, AR: adulto reproductivo, Pi: pichón.

**Tabla 15.** Aves halladas muertas entre noviembre del año 2002 y febrero del año 2003.

Especie	Estado	Edad	Sexo	Causa de la muerte	Lugar del hallazgo	Fecha
paloma antártica	muerto	AR	♂	traumatismo craneano	Península Esperanza	24/11/2002
pingüino Adelia	muerto	AR	♂	sin lesiones	Colonia de pingüino Adelia	28/11/2002
pingüino Adelia	muerto	AR	♂	traumatismos múltiples	Costa Noreste	09/12/2002
pingüino Adelia	muerto	AR	♂	traumatismos múltiples	Costa Noreste	10/12/2002
skua	muerto	AR	♂	sin lesiones	Costa Noreste	12/12/2002
skua	muerto	AR	(-)	evidentes cambios posmortem	Costa Noreste	21/12/2002
pingüino Adelia	muerto	Pi	(-)	sin lesiones	Colonia de pingüino Adelia	27/12/2002
pingüino Adelia	muerto	Pi	(-)	sin lesiones	Colonia de pingüino Adelia	27/12/2002
pingüino papua	muerto	AR	♂	traumatismos, granulomas parasitarios	Colonia de pingüino papua	08/01/2003
pingüino papua	muerto	AR	♀	traumatismos, granulomas parasitarios	Colonia de pingüino papua	08/01/2003
gaviota cocinera	muerto	Pi	(-)	evidentes cambios <i>posmortem</i>	Faro	26/01/2003
pingüino Adelia	muerto	Pi	(-)	sin lesiones	Colonia de pingüino Adelia	10/02/2003
pingüino Adelia	muerto	Pi	(-)	sin lesiones	Colonia de pingüino Adelia	10/02/2003

♂: macho, ♀: hembra, (-): sexo no determinado, AR: adulto reproductivo, Pi: pichón.

**Tabla 16.** Caracterización fenotípica de 7 cepas de *Pasteurella multocida* aisladas en la Antártida entre febrero del año 2000 y febrero del año 2001

Cepa	Origen	Año	Enfermedad	Hemólisis	MacConkey	Oxidasa	Catalasa	Indol	Ureasa	Nitrato	Ornitina decarboxilasa	Glucosa	Lactosa	Manitol	Trehalosa	Arabinosa	Sorbitol	Maltosa	Dulcitol	Manosa	Sacarosa	Xilosa	Especie	Subespecie	Tipo capsular	Serotipo somático
Petrel gigante del sur	Shetland del Sur	2000	si	-	-	+	+	+	-	+	AD	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	m	gg	A	1
Skua (pulmón)	Esperanza	2000	si	-	-	+	+	+	-	+	AD	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	m	gg	A	1
Skua (pulmón)	Esperanza	2001	si	-	-	+	+	+	-	+	AD	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	m	gg	A	1
Skua (boca)	Esperanza	2001	si	-	-	+	+	+	-	+	AD	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	m	gg	A	1
Gaviota (boca)	Esperanza	2001	si	-	-	+	+	+	-	+	AD	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	m	gg	A	1
Pingüino (hígado)	Esperanza	2001	si	-	-	+	+	+	-	+	AD	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	m	gg	A	1
Agua	Esperanza	2001	si	-	-	+	+	+	-	+	AD	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	m	gg	A	1

AD: ausencia de desarrollo. m: *multocida*. g: *gallicida* (Ver Tabla 6).

**Tabla 17a.** Concentración inhibitoria mínima de los antimicrobianos probados con las cepas de *Pasteurella multocida* aisladas en la Antártida entre los años 2000 y 2001.

CEPA	AIV	AMP	CEF	CFT	ENR	STR	FLO	GEN	TET	TIA	TIL
<b>Petrel</b>	128	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	4	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	8	16
<b>SK P 2000</b>	128	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	4	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	8	16
<b>SK P 2000</b>	128	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	8	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	8	16
<b>SK P</b>	128	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	8	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	8	32
<b>SK B</b>	128	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	4	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	8	16
<b>SK P</b>	128	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	4	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	8	16
<b>SK P</b>	128	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	8	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	8	16
<b>SK P</b>	128	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	4	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	8	16
<b>SK H</b>	128	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	8	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	8	32
<b>SK P</b>	128	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	4	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	8	16
<b>SK P</b>	128	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	8	16
<b>SK P</b>	128	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	4	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	8	16
<b>SK P</b>	128	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	4	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	8	16
<b>SK B</b>	128	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	4	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	8	16
<b>SK P</b>	128	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	8	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	8	32
<b>SK P</b>	128	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	4	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	8	16
<b>SK P</b>	128	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	8	≤ 0.5	2	≤ 0.5	8	32
<b>SK P</b>	128	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	8	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	8	32
<b>SK P</b>	128	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	4	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	8	16
<b>SK P</b>	128	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	8	16
<b>SK P</b>	128	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	4	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	8	16
<b>SK P</b>	128	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	8	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	8	32
<b>SK P</b>	128	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	4	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	8	16
<b>SK P</b>	128	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	8	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	8	16
<b>SK B</b>	128	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	4	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	8	16
<b>SK B</b>	128	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	4	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	8	16
<b>GAV B</b>	128	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	4	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	8	32
<b>GAV B</b>	128	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	8	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	8	16

AIV: aivlosin, AMP: ampicilina, CEF: cefalotina, CFT: ceftiofur, ENR: enrofloxacin, STR: estreptomycin, GEN: gentamicina, FLO: florfenicol, TET: tetraciclina, TIA: tiamulina, TIL: tilosina, SK: skua, GAV: gaviota cocinera, P: pulmón, H: hígado, B: cavidad buco-faríngea (Ver Tabla 6).

**Tabla 17b.** Concentración inhibitoria mínima de los antimicrobianos probados con las cepas de *Pasteurella multocida* aisladas en la Antártida entre los años 2000 y 2001.

CEPA	AIV	AMP	CEF	CFT	ENR	STR	FLO	GEN	TET	TIA	TIL
AGUA	128	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	8	16
ADE H	128	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	4	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	8	16
ADE H	128	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	4	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	8	16
ADE H	128	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	8	16
ADE H	128	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	4	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	8	16
ADE H	128	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	8	16
ADE P	128	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	8	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	8	16
ADE H	128	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	4	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	8	16
ADE H	128	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	8	16
ADE H	128	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	4	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	8	16
ADE H	128	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	8	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	8	16
ADE H	128	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	4	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	8	16
ADE H	128	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	4	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	8	16
ADE H	128	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	8	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	8	32
ADE H	128	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	4	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	8	16
ADE H	128	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	8	16
ADE H	128	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	4	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	8	16
ADE H	128	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	4	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	8	32
ADE H	128	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	4	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	8	16
ADE H	128	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	8	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	8	16
ADE H	128	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	4	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	8	16
ADE H	128	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	4	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	8	16
ADE H	128	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	4	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	8	16
ADE H	128	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	8	16
ADE H	128	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	8	32
ADE H	128	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	4	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	8	16
ADE H	128	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	4	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	8	16

AIV: aivlosin, AMP: ampicilina, CEF: cefalotina, CFT: ceftiofur, ENR: enrofloxacin, STR: estreptomycin, GEN: gentamicin, FLO: florfenicol, TET: tetracycline, TIA: tiamulina, TIL: tilosina, ADE: pingüino Adelia, P: pulmón, H: hígado.



**Tabla 18.** Caracterización fenotípica de las cepas de referencia de *Pasteurella multocida*

S 1	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	m	g	A	1
S 2	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	m	m	B	2 (2x5)
S 3	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	m	m	A	3
S 4	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	m	m	A	4
S 5	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	m	m	A	5 (5x2)
S 6	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	m	m	NT	6
S 7	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	m	m	A	7
S 8	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	m	s	NT	8
S 9	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	m	m	A	9
S 10	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	m	m	A	10
S 11	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	m	m	D	11
S 12	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	m	m	A	12
S 13	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	m	s	A	13
S 14	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	m	g	A	14
S 15	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	m	m	NT	15
S 16	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	m	m	A	16
ATCC	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	m	g	A	1

m: *multocida*. g: *gallicida*. s: *septica*. S1 a s16: cepas de *P. multocida* de referencia (ver Tabla 6). ATCC: cepa *P. multocida* ATCC 51689. (Ver Tabla 6).

**Tabla 19.** Concentración inhibitoria mínima de los antimicrobianos probados con las cepas de referencia de *Pasteurella multocida*.

CEPA	AIV	AMP	CEF	CFT	ENR	STR	FLO	GEN	TET	TIA	TIL
S1	128	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	8	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	16	16
S2	64	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	4	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	8	8
S3	32	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	4	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	4	8
S4	128	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	16	16
S5	128	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	4	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	16	16
S6	128	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	8	≤ 0.5	2	≤ 0.5	8	32
S7	128	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	32	≤ 0.5	2	≤ 0.5	32	64
S8	256	≤ 0.5	≤ 0.5	0.5	≤ 0.06	16	≤ 0.5	2	≤ 0.5	16	32
S9	128	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	16	≤ 0.5	4	≤ 0.5	16	32
S10	256	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	16	≤ 0.5	2	≤ 0.5	32	32
S11	128	2	1	≤ 0.25	≤ 0.06	8	2	≤ 1	≤ 0.5	64	32
S12	32	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	4	≤ 0.5	≤ 1	1	8	8
S13	128	≤ 0.5	≤ 0.5	0.5	≤ 0.06	16	≤ 0.5	≤ 1	1	16	16
S14	128	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	8	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	16	16
S15	256	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	16	≤ 0.5	2	≤ 0.5	64	32
S16	128	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	8	16
ATCC	64	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	8	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	16	16

AIV: aivlosin, AMP: ampicilina, CEF: cefalotina, CFT: ceftiofur, ENR: enrofloxacin, STR: estreptomycin, GEN: gentamicin, FLO: florfenicol, TET: tetracycline, TIA: tiamulina, TIL: tilosina, S1 a S16: cepas de *P. multocida* de referencia, ATCC: cepa *P. multocida* ATCC 51689 (Ver Tabla 6).



**Tabla 20.** Caracterización fenotípica de las cepas de *Pasteurella multocida* aisladas de gallinas reproductoras.

001	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	m	g	A	1
002	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	m	m	A	3
003	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	m	m	A	3xw4
004	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	m	m	A	NT
005	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	m	m	A	12
006	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	m	m	NT	2x5
009	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	m	m	A	3
010	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	m	m	A	3
011	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	m	g	A	1
013	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	m	s	A	1
B-82	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	m	g	A	1

m: *multocida*. g: *gallicida*. s: *septica*. 001, 002, 004, 005, 006, 009, 010, 011 y 013: cepas aisladas en Argentina.

003: cepa aislada en Uruguay. B82: cepa aislada en Australia (Ver Tabla 6).

**Tabla 21.** Concentración inhibitoria mínima de los antimicrobianos probados con las cepas de *Pasteurella multocida* aisladas de cerdos y aves comerciales de diferente origen.

CEPA	AIV	AMP	CEF	CFT	ENR	STR	FLO	GEN	TET	TIA	TIL
<b>001</b>	64	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	8	≤ 0.5	2	≤ 0.5	8	16
<b>002</b>	64	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	8	16
<b>003</b>	64	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	1	16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	8	8
<b>004</b>	64	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	0.125	8	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	8	8
<b>005</b>	128	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	4	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	16	16
<b>006</b>	128	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	4	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	8	32
<b>009</b>	128	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	4	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	16	16
<b>010</b>	64	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	16	64
<b>011</b>	128	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	8	32
<b>013</b>	128	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	4	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	16	16
<b>B82</b>	128	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	8	≤ 0.5	2	≤ 0.5	8	16
<b>C1</b>	256	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	16	≤ 0.5	2	≤ 0.5	32	32
<b>C2</b>	256	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	≥ 64	≤ 0.5	2	≤ 0.5	32	32
<b>C3</b>	256	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	≥ 64	≤ 0.5	2	≤ 0.5	32	32
<b>C4</b>	128	≤ 0.5	≤ 0.5	0.5	≤ 0.06	16	≤ 0.5	2	≤ 0.5	32	32
<b>C5</b>	256	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	≥ 64	≤ 0.5	2	≤ 0.5	32	32
<b>C6</b>	256	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	≥ 64	≤ 0.5	2	≤ 0.5	32	32
<b>C7</b>	256	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	4	≤ 0.5	≤ 1	32	32	32
<b>C8</b>	128	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	16	≤ 0.5	≤ 1	≤ 0.5	16	16
<b>C9</b>	256	≤ 0.5	1	≤ 0.25	≤ 0.06	≥ 64	≤ 0.5	2	≤ 0.5	32	32
<b>C10</b>	128	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.06	≥ 64	≤ 0.5	2	≤ 0.5	32	16

AIV: aivlosin, AMP: ampicilina, CEF: cefalotina, CFT: ceftiofur, ENR: enrofloxacin, STR: estreptomycin, GEN: gentamicin, FLO: florfenicol, TET: tetracycline, TIA: tiamulina, TIL: tilosina. 001, 002, 004, 005, 006, 009, 010, 011 y 013: cepas de *P. multocida* aisladas de aves comerciales de Argentina. 003: cepa de *P. multocida* aislada de aves comerciales de Uruguay. B82: cepa de *P. multocida* aislada de aves comerciales de Australia. C1 a C10: cepas de *P. multocida* aisladas de cerdos comerciales de la Provincia de Buenos Aires, Argentina (Ver Tabla 6).

**Tabla 22.** Caracterización fenotípica de las cepas de *Pasteurella multocida* aisladas de cerdos de la provincia de Buenos Aires.

Cepa	Hemólisis	Mac Conkey	Oxidasa	Catalasa	Indol	Ureasa	Nitrato	Ornitina decarboxilasa	Glucosa	Lactosa	Manitol	Trehalosa	Arabinosa	Sorbitol	Maltosa	Dulcitol	Manosa	Sacarosa	Xilosa	Especie	Subespecie	Tipo capsular	Serotipo somático
C 1	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	m	m	D	3x5
C 2	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	m	m	A	3
C 3	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	m	m	A	3
C 4	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	m	m	D	w3
C 5	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	m	m	D	3x5
C 6	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	m	m	A	3
C 7	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	m	m	D	3x5
C 8	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	m	m	A	w4
C 9	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	m	m	D	3x5
C 10	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	m	m	A	3

m: *multocida* (Ver Tabla 6).

**Tabla 23.** Tasa de mortalidad en las poblaciones de aves voladoras de Bahía Esperanza durante las temporadas reproductivas 2000-2001, 2001-2002 y 2002-2003.

Temporada	Tasa de mortalidad (%)			
	skua	gaviota cocinera	Paloma antártica	promedio
2000-2001	30,6	2,8	1,1	11,5
2001-2002	4,6	1,8	0,0	2,1
2002-2003	1,8	0,4	1,4	1,2
promedio	12,3	1,7	0,8	4,9

**Tabla 24.** Tasa de mortalidad de skua y gaviota cocinera en Esperanza durante las temporadas temprana y tardía 2000-2001, 2001-2002 y 2002-2003.

Año	Tasa de mortalidad (%)					
	Temporada temprana			Temporada tardía		
	skua	gaviota cocinera	promedio	skua	Gaviota Cocinera	promedio
<b>2000-2001</b>	0,0	1,4	<b>0,7</b>	30,6	1,4	<b>16</b>
<b>2001-2002</b>	1,8	0,6	<b>1,2</b>	1,8	1,2	<b>1,5</b>
<b>2002-2003</b>	1,8	0,0	<b>0,9</b>	0,0	0,4	<b>0,2</b>
<b>Promedio</b>	<b>1,2</b>	<b>0,7</b>	<b>0,9</b>	<b>10,8</b>	<b>1</b>	<b>5,9</b>

**ANEXO I. Clasificación taxonómica de la Familia *Pasteurellaceae***

Lista de Géneros y Especies que conforman la Familia *Pasteurellaceae*, basada en el *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edition, vol. 2 (Springer, New York) (in press), y preparada por el Subcomité de Taxonomía para *Pasteurellaceae* del Comité Internacional de Sistemática de Procariotes, disponible a partir del mes de enero de 2005.

**Genero I. *Pasteurella*** (genero tipo)

*Pasteurella multocida* (Especie tipo)

*Pasteurella multocida* subsp. *multocida*

*Pasteurella multocida* subsp. *gallicida*

*Pasteurella multocida* subsp. *septica*

*Pasteurella pneumotropica*

*Pasteurella testudinis*

*Pasteurella aerogenes*

*Pasteurella canis*

*Pasteurella dagmatis*

*Pasteurella langaaensis*

*Pasteurella stomatis*

*Pasteurella bettyae*

*Pasteurella caballi*

*Pasteurella mairii*

*Pasteurella trehalosi*

*Pasteurella skyensis*

**Genus II. *Actinobacillus***

*Actinobacillus lignieresii* (Especie tipo)

*Actinobacillus actinomycetemcomitans*

*Actinobacillus equuli* subsp. *equuli*

*Actinobacillus equuli* subsp. *haemolyticus*

*Actinobacillus capsulatus*

*Actinobacillus suis*

*Actinobacillus pleuropneumoniae*

*Actinobacillus hominis*

*Actinobacillus ureae*

*Actinobacillus muris*

*Actinobacillus seminis*

*Actinobacillus indolicus*

*Actinobacillus minor*

*Actinobacillus porcinus*

*Actinobacillus roiz*

*Actinobacillus delphinicola*

*Actinobacillus scotia*

*Actinobacillus succinogenes*

*Actinobacillus arthritidis*

**Genus III. *Haemophilus***

*Haemophilus influenzae* (Especie tipo)

*Haemophilus haemolyticus*

*Haemophilus aegyptius*

*Haemophilus parainfluenzae*

*Haemophilus ducreyi*

*Haemophilus haemoglobinophilus*

*Haemophilus aphrophilus*

*Haemophilus parahaemolyticus*

*Haemophilus paraphrophilus*

*Haemophilus paraseis*

*Haemophilus paraphrohaemolyticus*

*Haemophilus segnis*

*Haemophilus paracuniculus*

*Haemophilus felis*

*Haemophilus pittmaniae*

**Genero IV. *Lonepinella***

*Lonepinella koalarum* (Especie tipo)

**Genero V. *Mannheimia***

*Mannheimia haemolytica* (Especie tipo)

*Mannheimia glucosida*

*Mannheimia granulomatis*

*Mannheimia ruminalis*

*Mannheimia varigena*

**Genero VI. *Phocoenobacter***

*Phocoenobacter uteri* (Especie tipo)

**Genero VII. *Gallibacterium***

*Gallibacterium anatis* (Especie tipo)

**Genero VIII. *Histophilus***

*Histophilus somni* (Especie tipo)

**Genero VIII. *Volucribacter***

*Volucribacter psittacida* (Especie tipo)

*Volucribacter amazonae*

**Genero IX. *Avibacterium***

*Avibacterium gallinarum* (Especie tipo)

*Avibacterium avium*

*Avibacterium paragallinarum*

*Avibacterium volantium*

**Otros microorganismos pertenecientes a la Familia *Pasteurellaceae***

*Pasteurella* sp. A

*Pasteurella* sp. B

*Actinobacillus* genomosp. 2

*Actinobacillus porciconsillarum*



*Gallibacterium* genomsp. 1

Taxon 2

Taxon 3

Taxon 5

Taxon 6

Taxon 7

Taxon 8

Taxon 10

Taxon 14

Taxon 16

Taxon 17

Taxon 26 (similar a *Actinobacillus*)

### **Especies sugeridas para ser excluidas de su respectivo Género**

***Pasteurella***: *P. pneumotropica*, *P. aerogenes*, *P. testudinis*, *P. bettyae*, *P. caballi*, *P. mairii*, *P. skyensis*, *P. trehalosi*.

***Actinobacillus***: *A. actinomycetemcomitans*, *A. capsulatus*, *A. muris*, *A. seminis*, *A. delphinicola*, *A. indolicus*, *A. minor*, *A. porcinus*, *A. rossii*, *A. scotia*, *A. succinogenes*.

***Haemophilus***: *H. parainfluenzae*, *H. ducreyi*, *H. haemoglobinophilus*, *H. aphrophilus*, *H. parahaemolyticus*, *H. paraphrophilus*, *H. parasuis*, *H. paraphrohaemolyticus*, *H. segnis*, *H. paracuniculus*, *H. felis*.

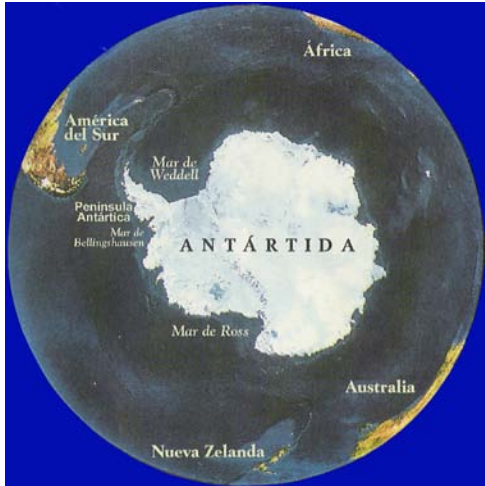


Figura 1

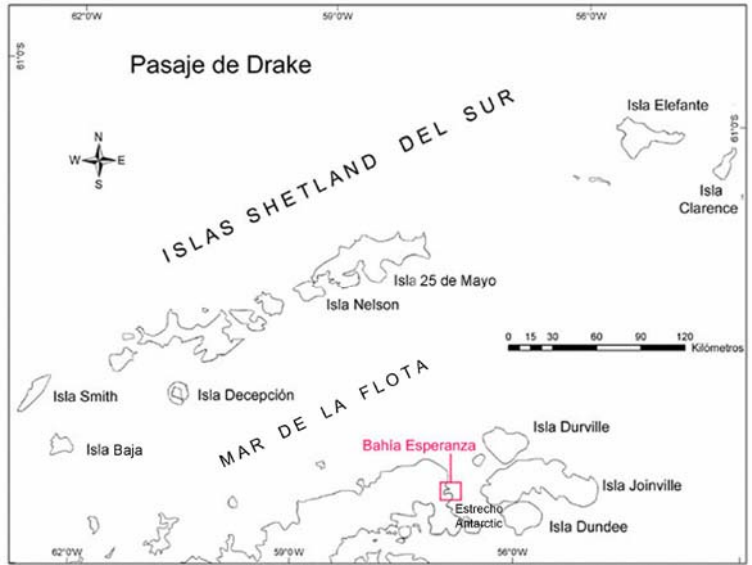


Figura 1b. Extremo Noreste de la Península Antártica, Islas Durville, Joinville y Dundee, e Islas Shetland del Sur



Figura 1a. Mapa de la Península Antártica.



Figura 2. Mapa de Bahía Esperanza.



**Figura 3.** Aves que nidifican en Bahía Esperanza: a) pingüino Adelia (*Pygoscelis adeliae*), b) pingüino papua (*P. papua*), c) skua (*Catharacta* sp.), d) gaviota cocinera (*Larus dominicanus*) e) paloma antártica (*Chionis alba*), f) petrel gigante del sur (*Macronectes giganteus*)



**Figura 4.** Vista parcial de la colonia de pingüino Adelia en Bahía Esperanza durante el verano 2000-2001.



**Figura 5.** Base Antártica Esperanza. Detrás se observa el Monte Flora.



**Figura 6.** Gaviotas cocineras en un basural a cielo abierto ubicado en Avellaneda, provincia de Buenos Aires.

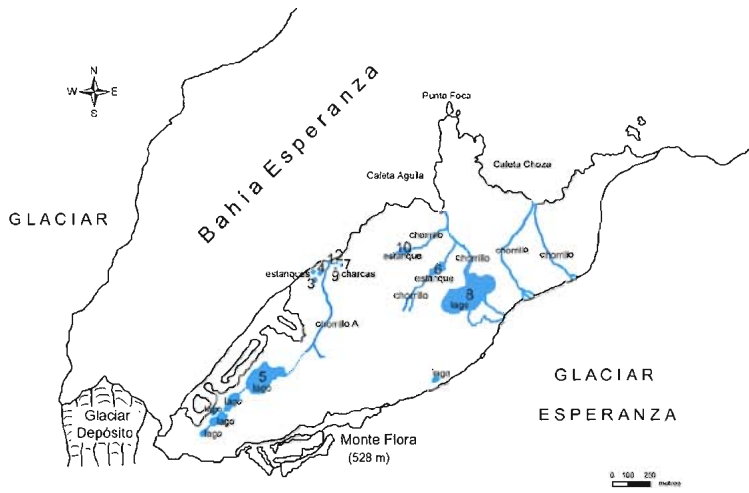


Figura 7. Distribución de los cuerpos de agua dulce durante enero y febrero de los años 2000, 2001 y 2002.

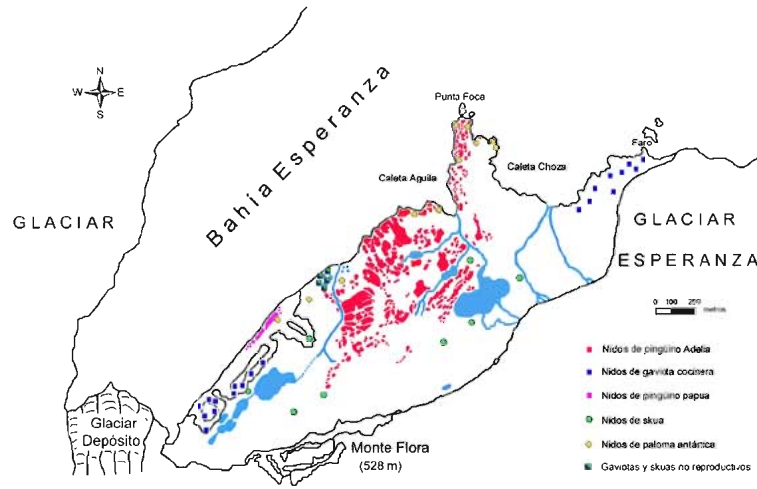


Figura 8. Áreas de nidificación y asentamiento de skuas, gaviota cocinera, paloma antártica, pingüino Adelia y pingüino papua durante enero y febrero del año 2000 en Bahía Esperanza

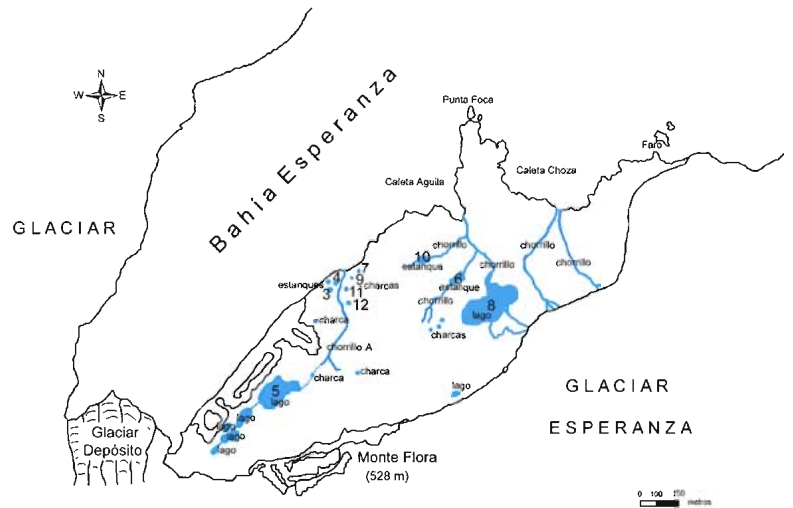


Figura 9. Distribución de los cuerpos de agua dulce durante enero y febrero del año 2003.

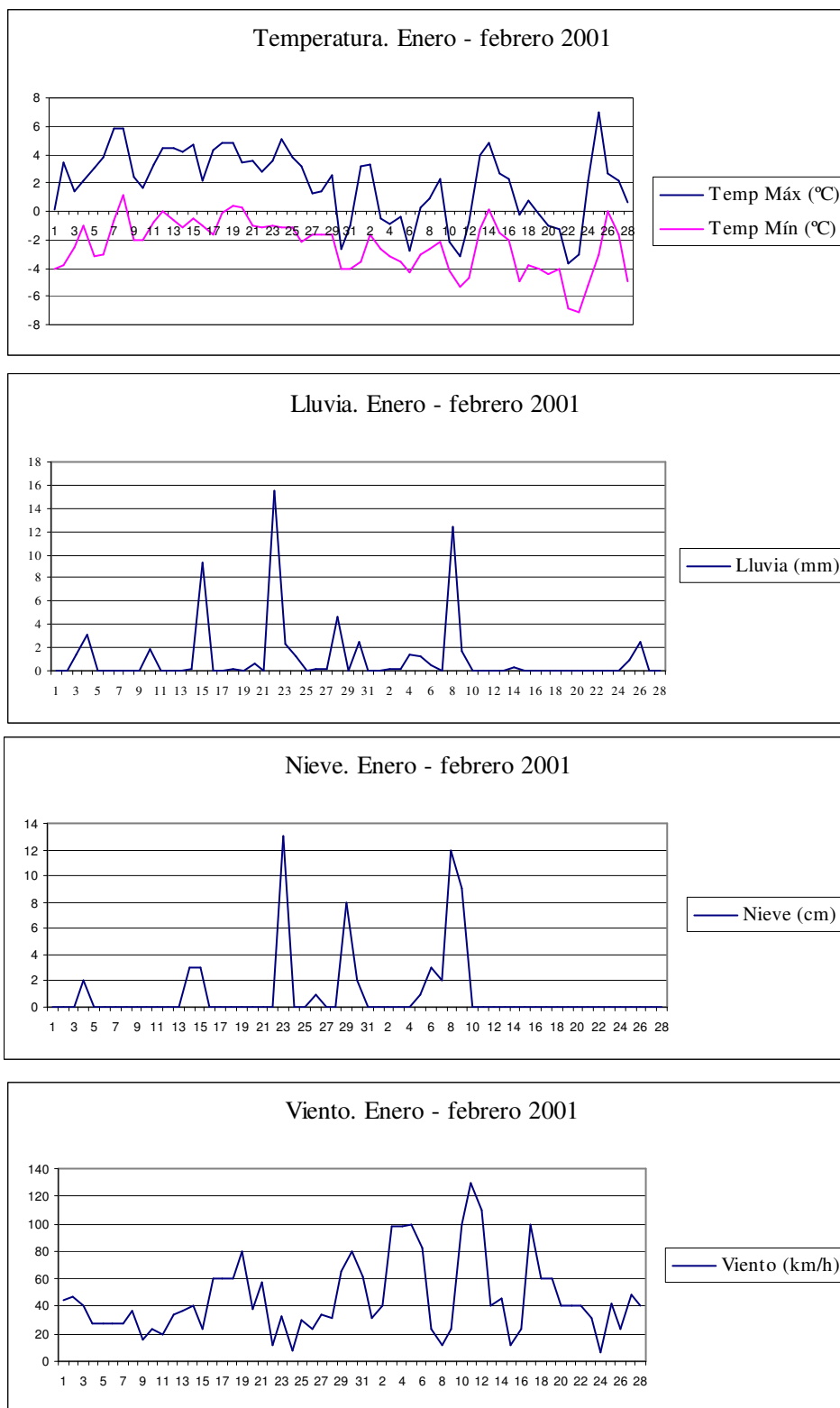


**Figura 10.** Cuerpo de agua dulce 1 (charca), sitio en torno al cual se hallaron las aves muertas por Cólera Aviar durante el verano 2000-2001. Los skuas ubicados alrededor de la charca son aves moribundas que no se alejaron ante la presencia humana.

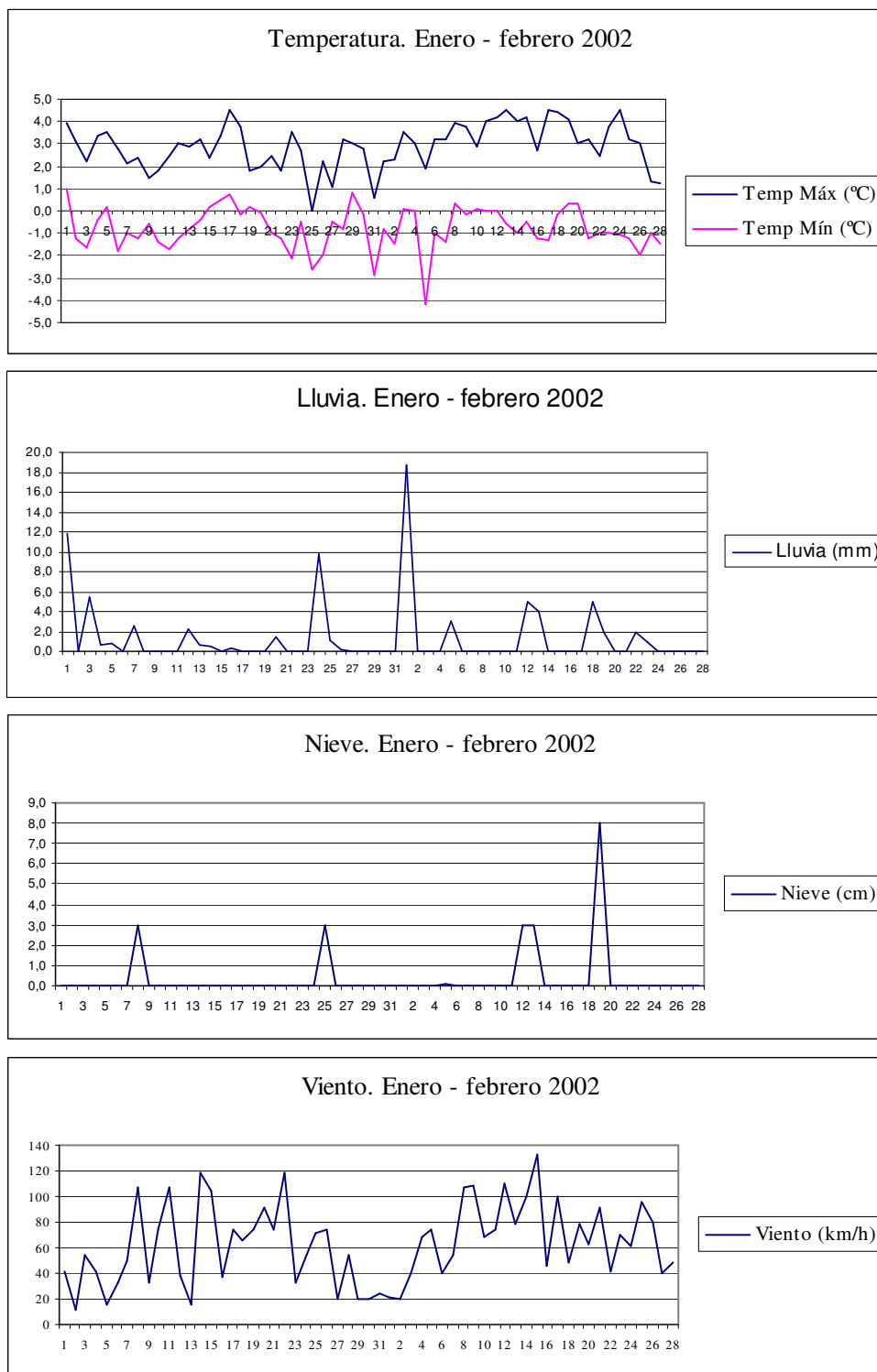


**Figura 11.** Cuerpos de agua dulce 3 y 4 (estanques), sitio en torno al cual se hallaron las aves muertas por Cólera Aviar durante el verano 1999-2000.

**Figura 12.** Registros diarios de temperatura, precipitaciones (lluvia y nieve), y viento, correspondiente a los meses de enero y febrero del año 2001 en Bahía Esperanza.

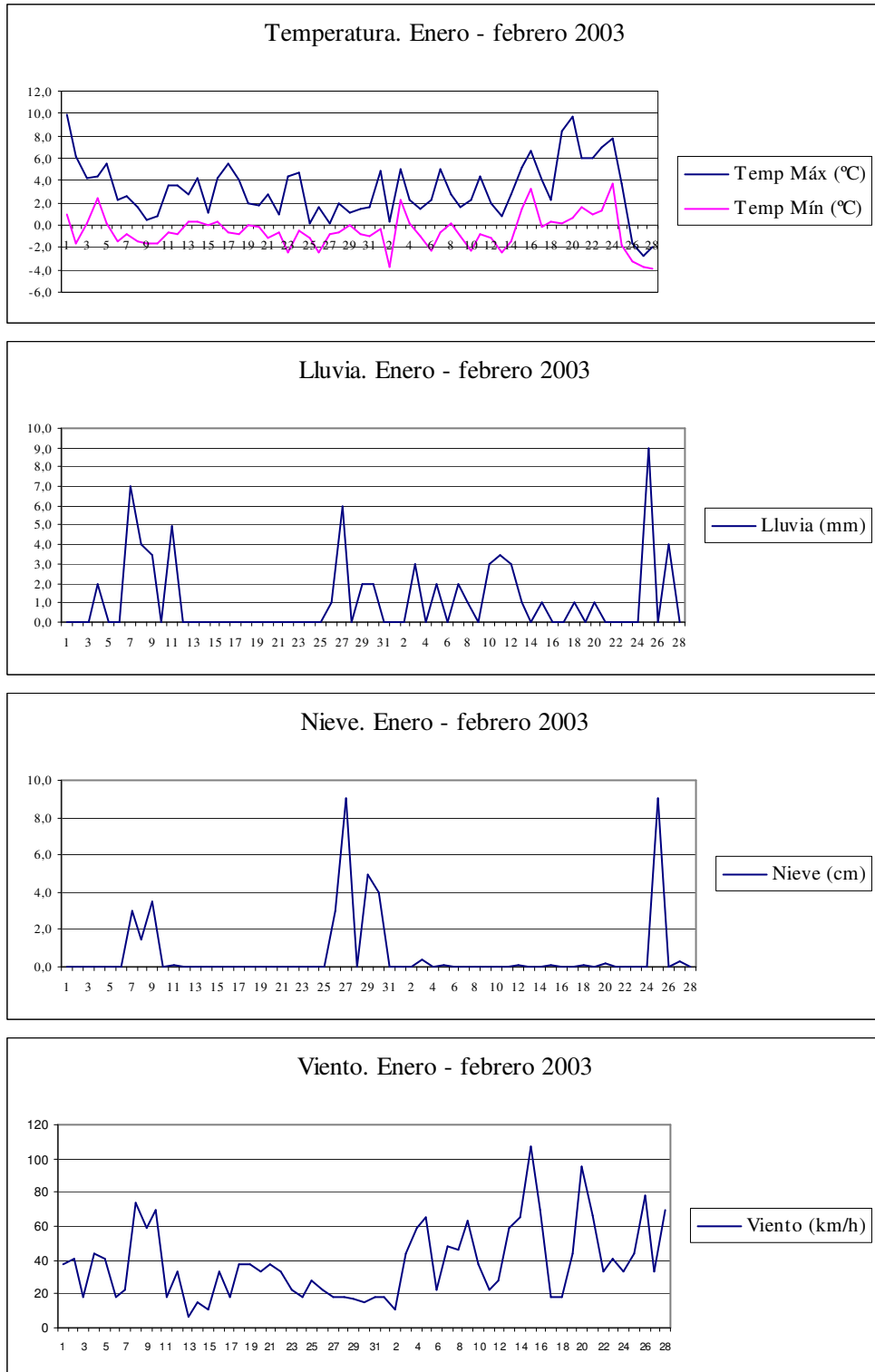


**Figura 13.** Registros diarios de temperatura, precipitaciones (lluvia y nieve), y viento, correspondiente a los meses de enero y febrero del año 2002 en Bahía Esperanza.





**Figura 14.** Registros diarios de temperatura, precipitaciones (lluvia y nieve), y viento correspondiente a los meses de enero y febrero del año 2003 en Bahía Esperanza.



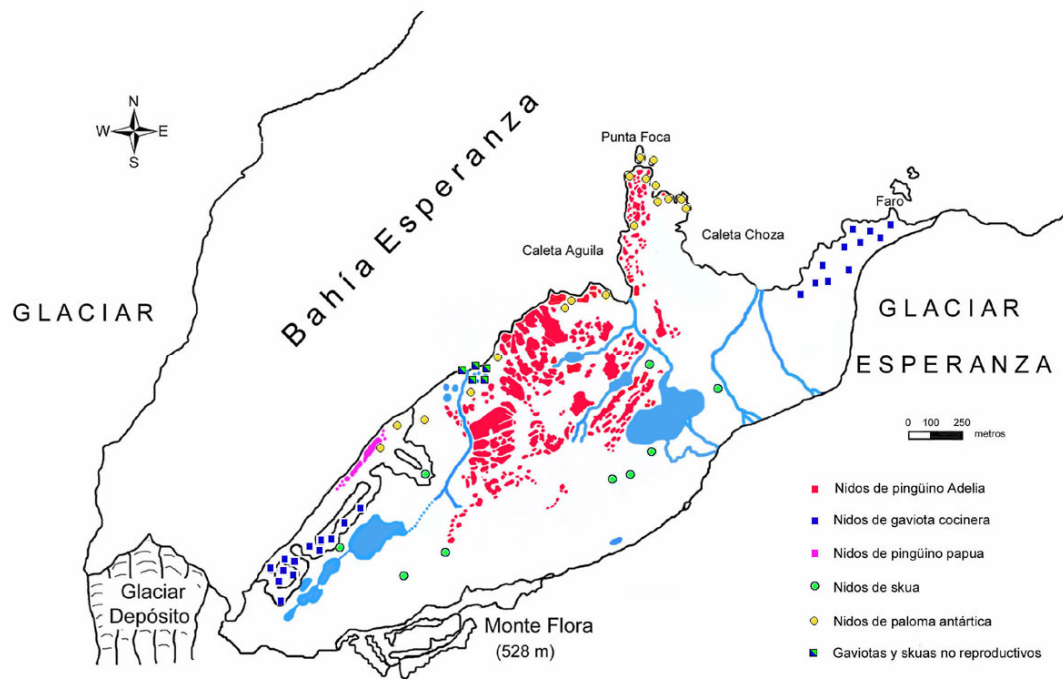


Figura 15. Areas de nidificación y asentamiento de skuas, gaviota cocinera, paloma antártica, pingüino Adelia y pingüino papua durante enero y febrero del año 2001.



**Figura 16.** Adelante skuas no reproductivos, atrás gaviotas cocineras no reproductivas que arribaron a Bahía Esperanza el 1 de enero del año 2001 y compartieron el nicho ecológico con los skuas no reproductivos.

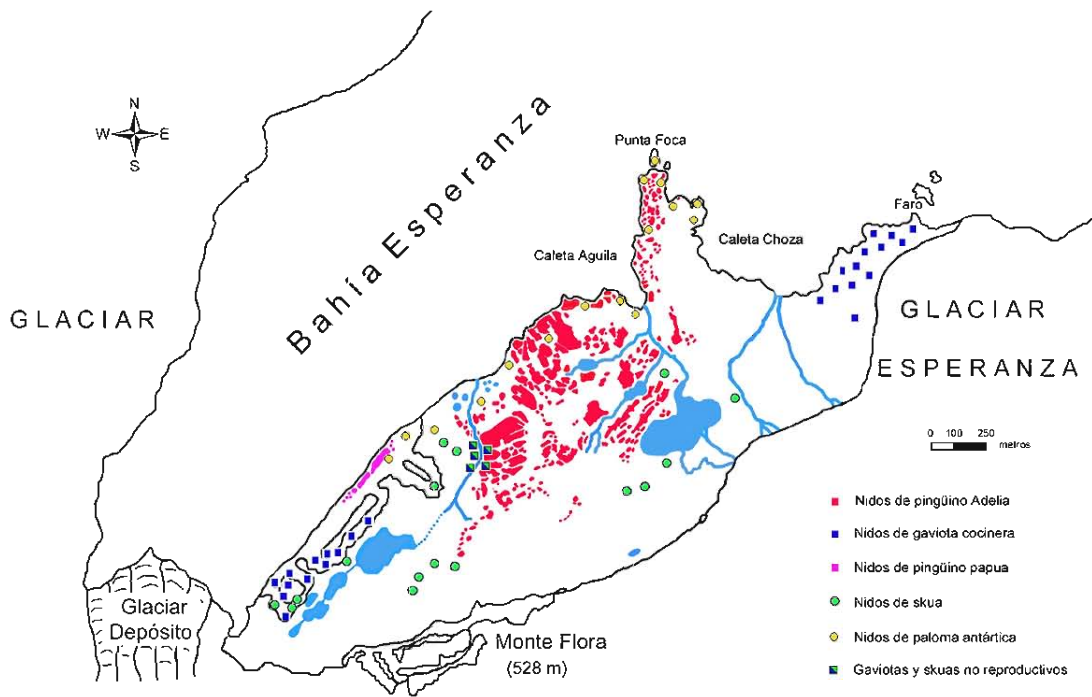


Figura 17. Areas de nidificación y asentamiento de skuas, gaviota cocinera, paloma antártica, pingüino Adelia y pingüino papua durante enero y febrero del año 2002.

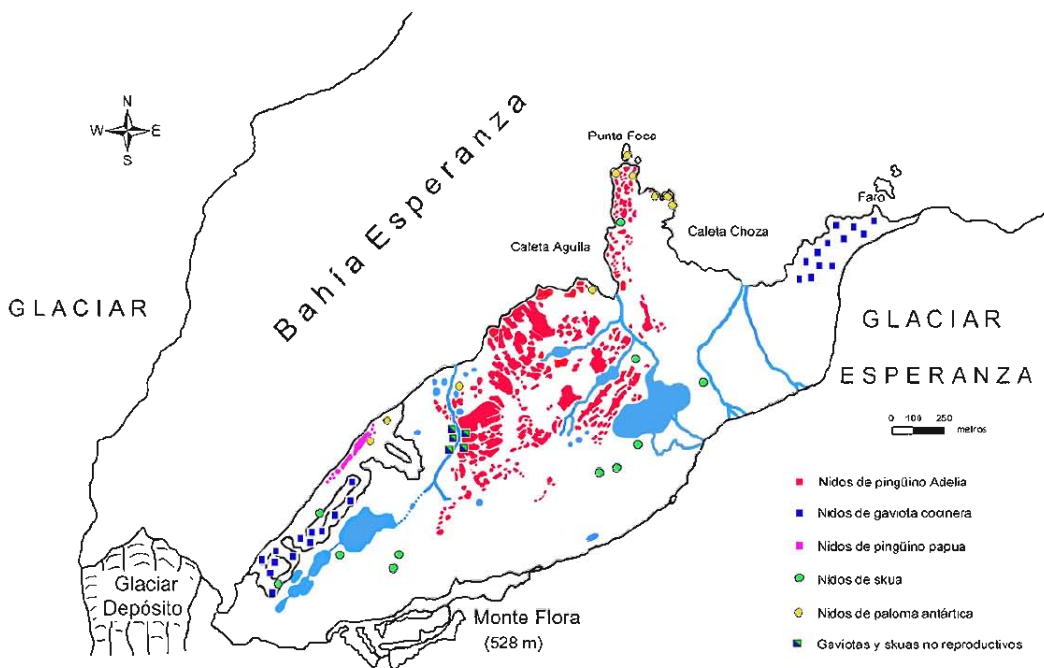
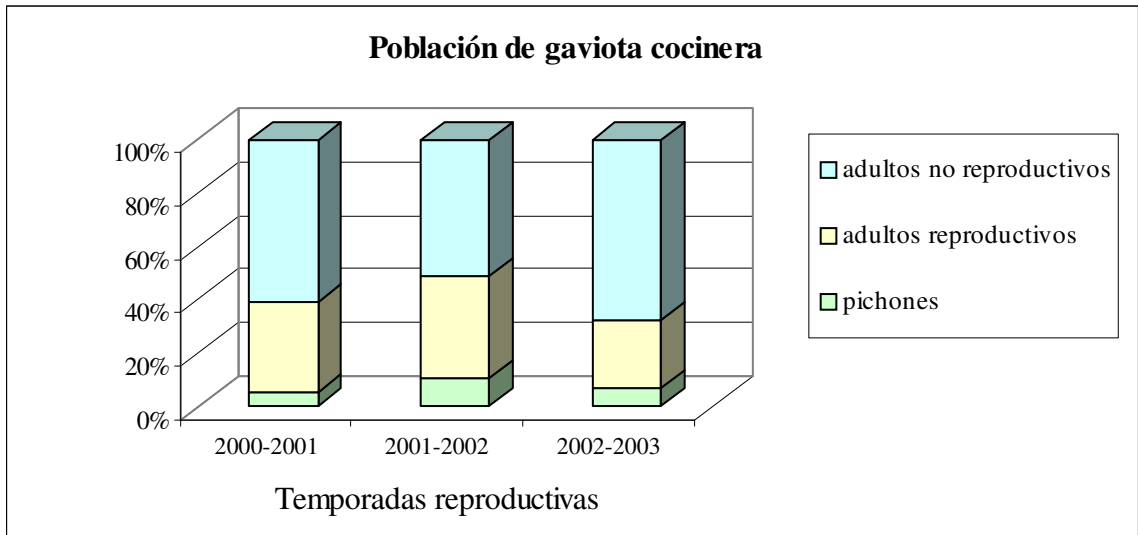
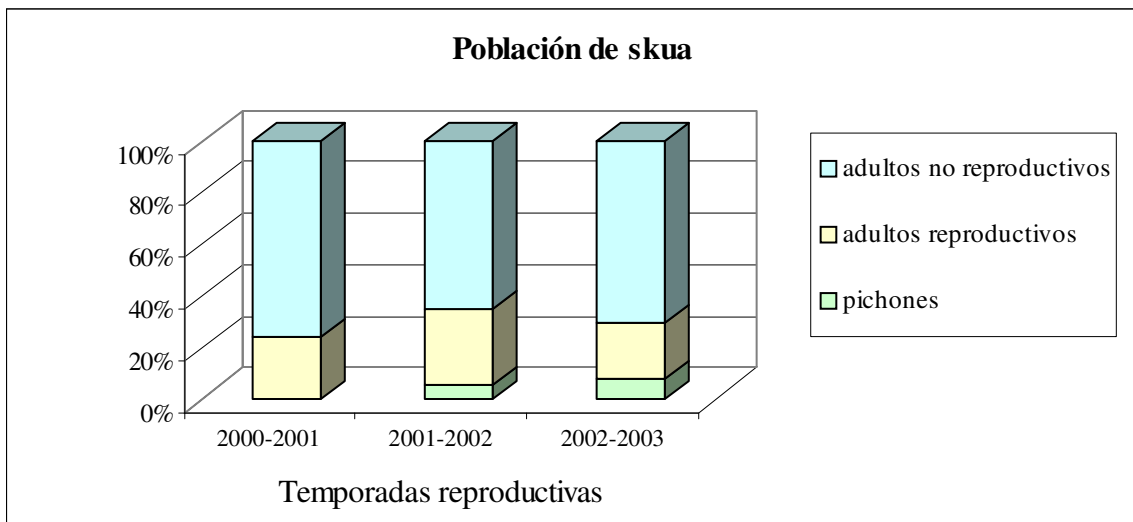


Figura 18. Areas de nidificación y asentamiento de skuas, gaviota cocinera, paloma antártica, pingüino Adelia y pingüino papua durante enero y febrero del año 2003.

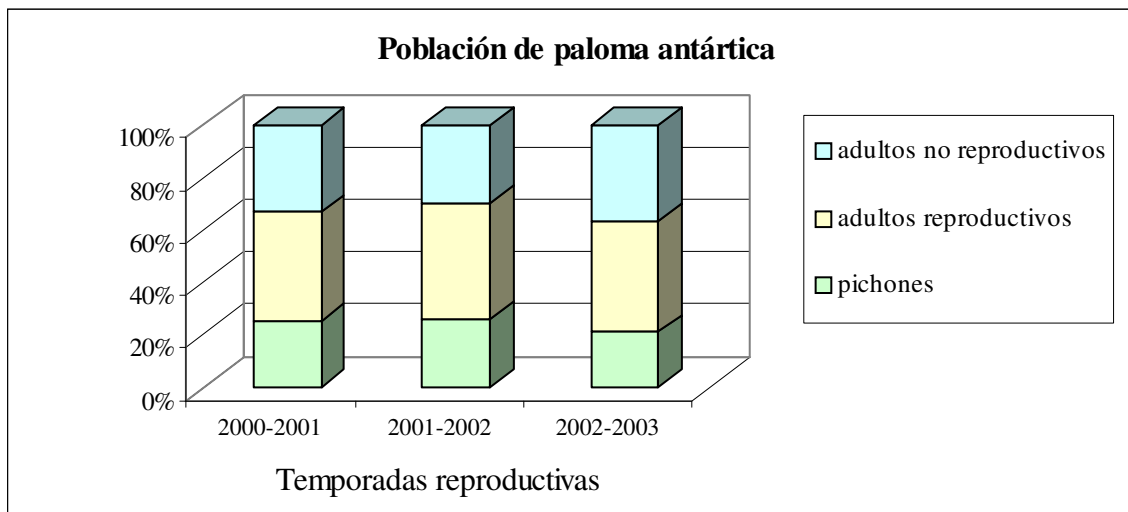
**Figura 19.** Distribución de la población de gaviota cocinera según las distintas categorías etarias durante las temporadas reproductivas 2000-2001, 2001-2002 y 2002-2003, en Bahía Esperanza.



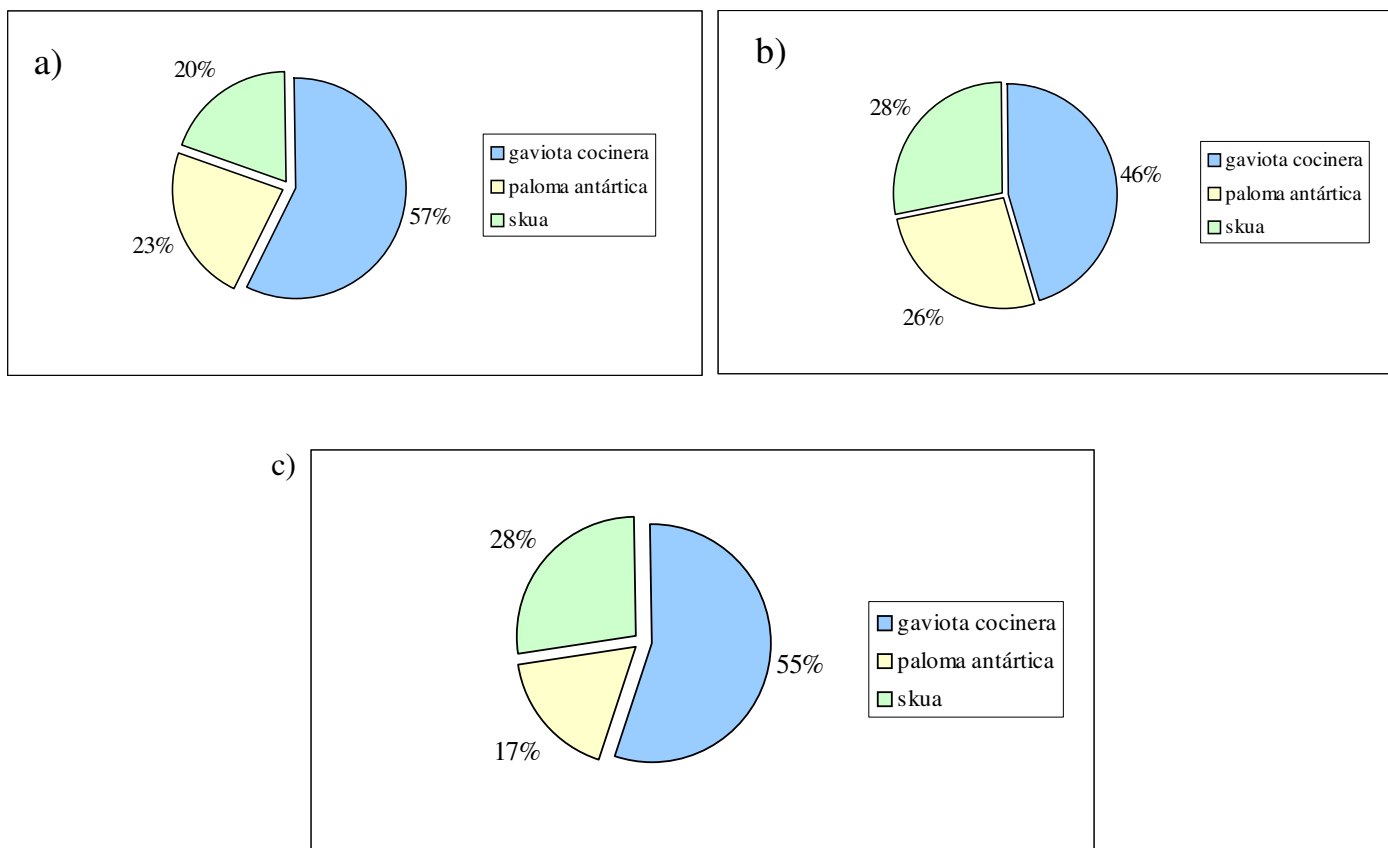
**Figura 20.** Distribución de la población de skua según las distintas categorías etarias durante las temporadas reproductivas 2000-2001, 2001-2002 y 2002-2003, en Bahía Esperanza.



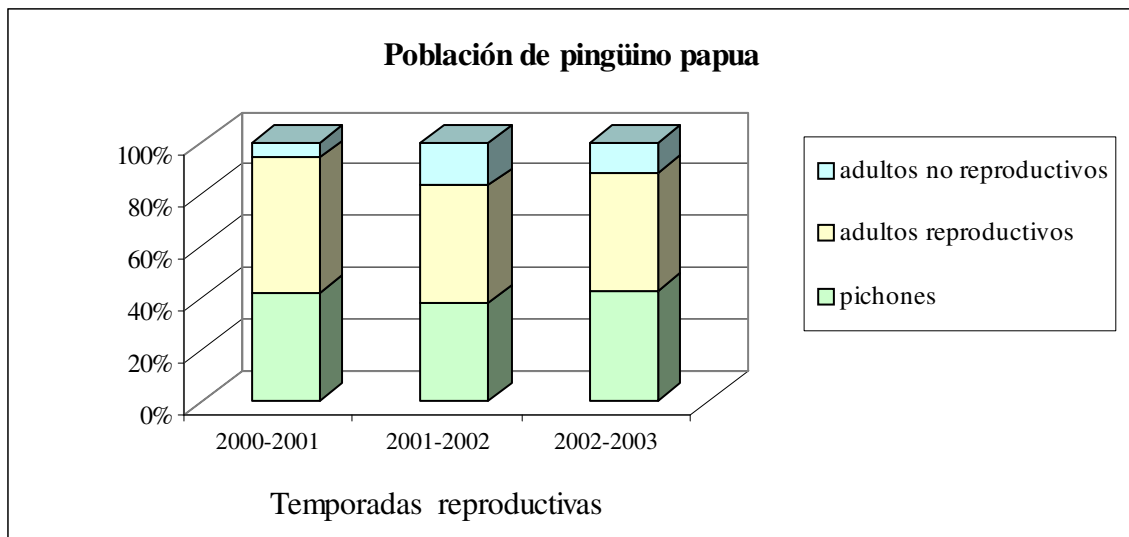
**Figura 21.** Distribución de la población de paloma antártica según las distintas categorías etarias durante las temporadas reproductivas 2000-2001, 2001-2002 y 2002-2003, en Bahía Esperanza.



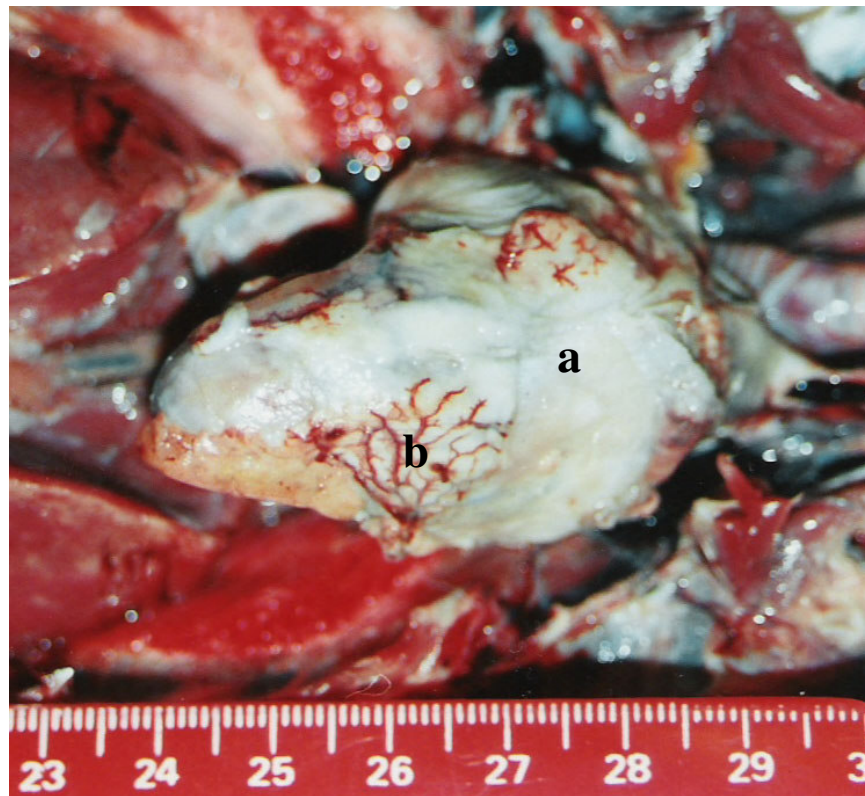
**Figura 22.** Distribución poblacional de las aves voladoras durante las temporadas reproductivas a) 2000-2001, b) 2001-2002, y c) 2001-2003, en Bahía Esperanza.



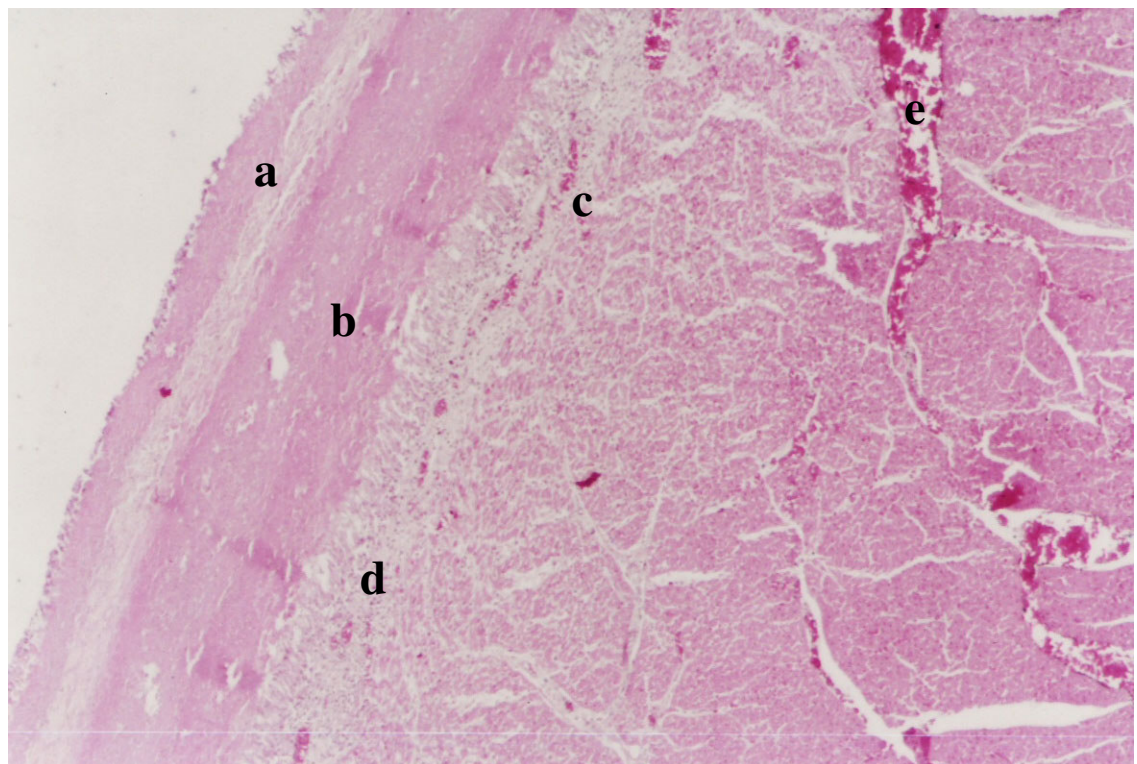
**Figura 23.** Distribución de la población de pingüino papua según las distintas categorías etarias durante las temporadas reproductivas 2000-2001, 2001-2002 y 2002-2003, en Bahía Esperanza.



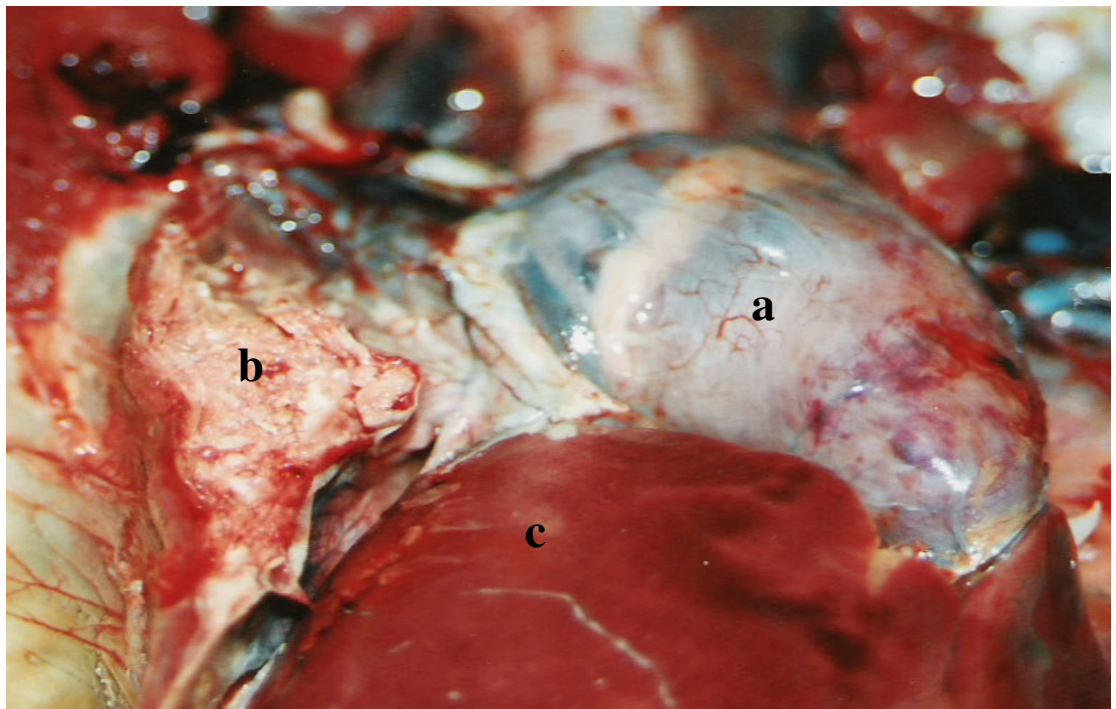
**Figura 24.** Carcasis de skuas muertos durante el verano 2000-2001 en Bahía Esperanza.



**Figura 25.** Corazón de skua. Diagnóstico patológico presuntivo de Cólera Aviar subagudo: a) se observa un gran acúmulo de fibrina, b) hiperemia.



**Figura 26.** Corte transversal del corazón y el pericardio de un skua. Diagnóstico patológico presuntivo de Cólera Aviar subagudo (100X): a) pericardio y b) epicardio con abundante cantidad de fibrina, c) hemorragia subepicárdica, d) infiltración celular, e) hemorragia en el miocardio

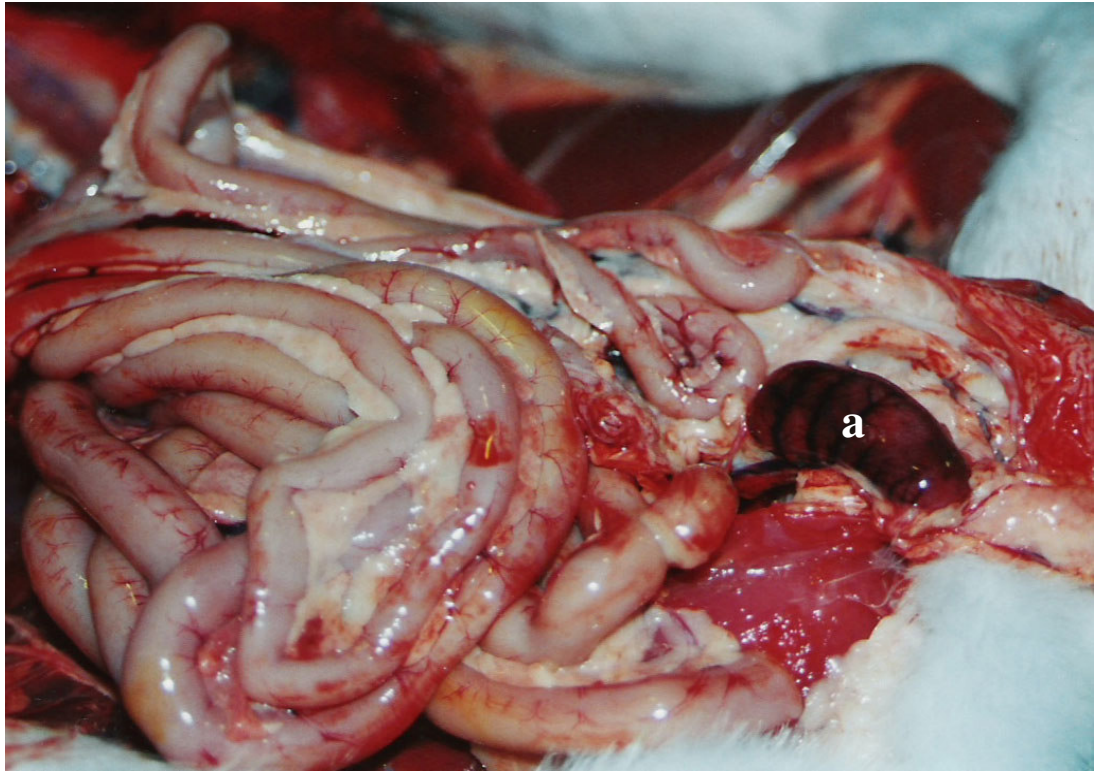


**Figura 27.** Organos celómicos de un skua con diagnóstico patológico presuntivo de Cólera Aviar subagudo: a) corazón con pericarditis fibrinosa y hemorragia, b) corte transversal del pulmón derecho con neumonía c) hígado sin lesiones macroscópicas.

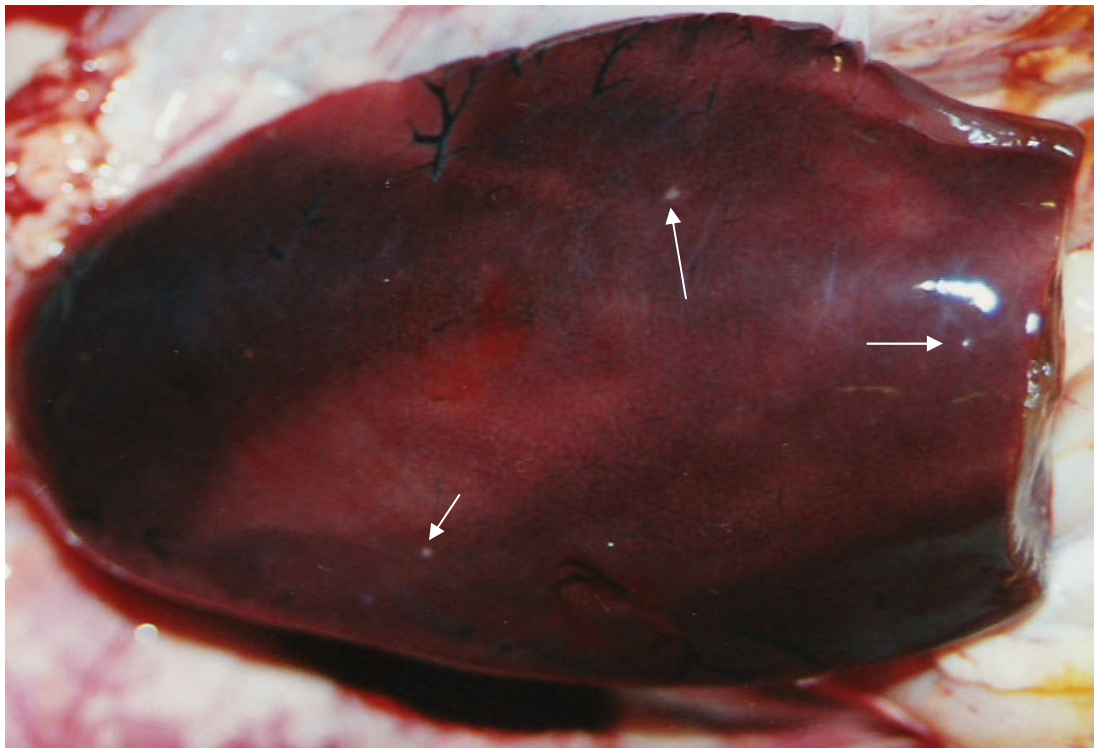


**Figura 28.** Gaviota cocinera con Diagnóstico patológico presuntivo de Cólera Aviar Crónico. Hiperemia y hemorragia en la región periocular..

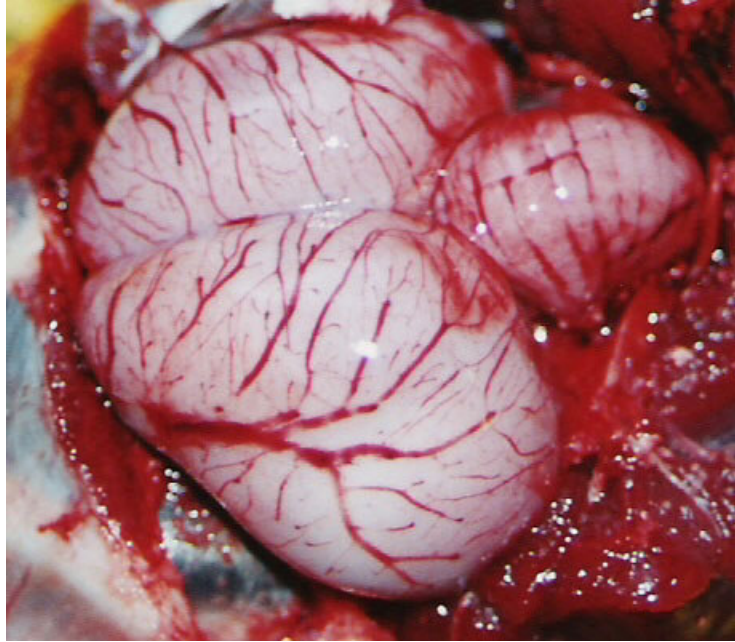




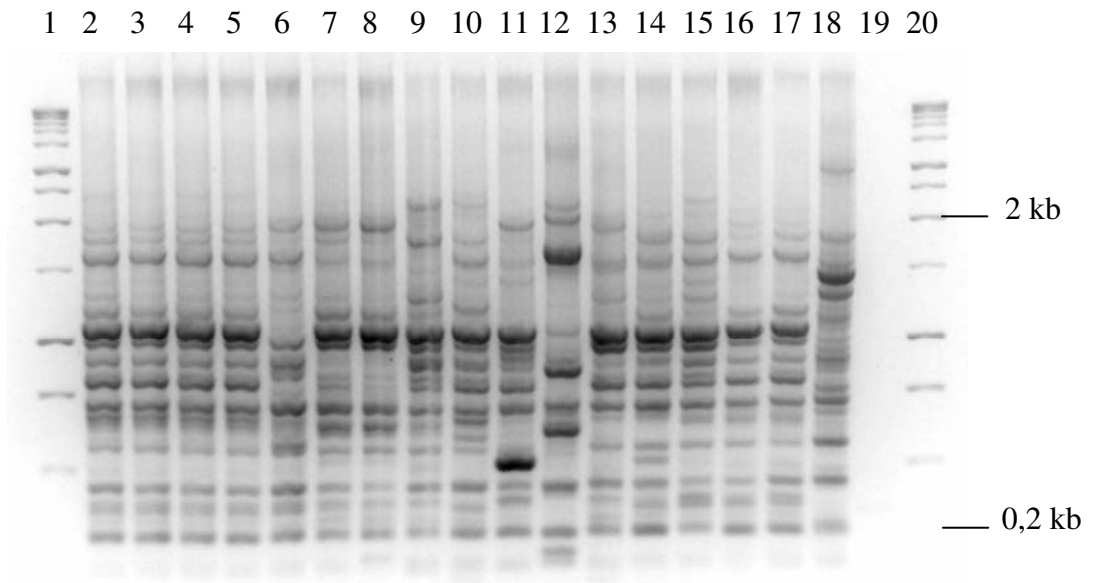
**Figura 29.** Organos celómicos de un pingüino Adelia. Diagnóstico patológico presuntivo de Cólera Aviar agudo: hiperemia y hemorragia generalizada, a) esplenomegalia



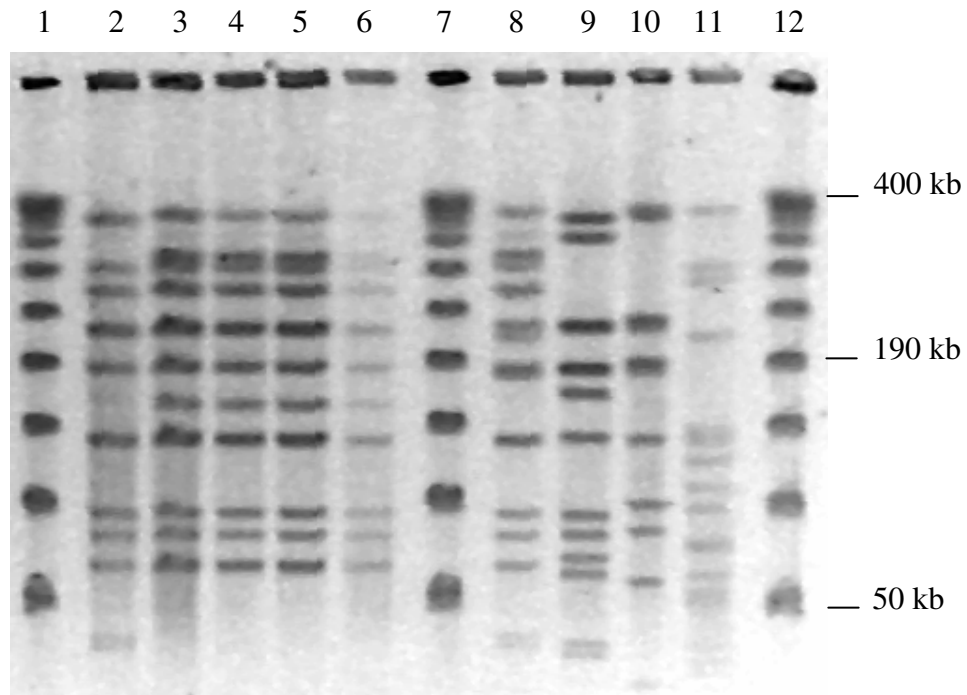
**Figura 30.** Hígado de un pingüino Adelia. Diagnóstico patológico presuntivo de Cólera Aviar agudo: el órgano se encuentra aumentado de tamaño y presenta pequeñas áreas necróticas



**Figura 31.** Cerebro y cerebelo de un pingüino Adelia. Diagnóstico patológico presuntivo de Cólera Aviar agudo. Se observa hiperemia y hemorragia en los estratos externos de las meninges



**Figura 32.** Resultados obtenidos mediante ERIC-PCR al comparar cepas de *P. multocida* aisladas en la Antártida con aislamientos de aves domésticas. Calles 2 a 5: cepas de *P. multocida* aisladas en Bahía Esperanza (agua dulce, gaviota cocinera, skua, pingüino Adelia). Calles 6 a 18: cepas de *P. multocida* aisladas de aves domésticas. Calle 19: control de sistema. Calles 1 y 20: Ladder Marker.



**Figura 33.** Resultados obtenidos mediante *ApaI*-PFGE al comparar cepas de *P. multocida* aisladas en la Antártida con cepas de referencia de *P. multocida*.

Calle 2: cepa X-73, *P. multocida gallicida* A:1.

Calle 3: cepa aislada de un petrel gigante del sur en las Islas Shetland del Sur en febrero del año 2000.

Calle 4: cepa aislada de pulmón de skua en Bahía Esperanza en febrero del año 2000.

Calle 5: cepa aislada de un cuerpo de agua dulce en Bahía Esperanza en febrero del año 2001.

Calle 6 cepa aislada de cavidad bucofaríngea de gaviota cocinera en enero del año 2001.

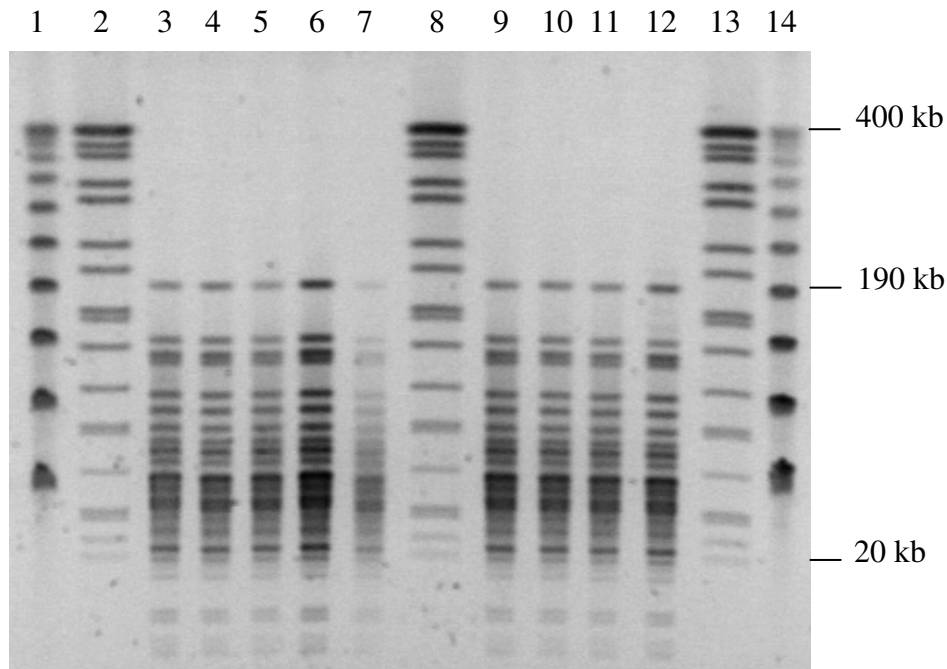
Calle 8: cepa NADC P-2225, *P. multocida gallicida* A:14.

Calle 9: cepa NADC P-2237, *P. multocida multocida* NT:15.

Calle 10: cepa NADC P-2237, *P. multocida multocida* A:16.

Calle 11: cepa NADC P-1997, *P. multocida multocida* A:7.

Calles 1, 7 y 12: Lambda Ladder PFGE Marker.



**Figura 34.** Resultados obtenidos mediante *SmaI*-PFGE al comparar cepas de *P. multocida* aisladas en la Antártida durante los veranos 1999-2000 y 2000-2001.

Calle 3: cepa aislada de un petrel gigante del sur en las Islas Shetland del Sur en febrero del año 2000.

Calle 4: cepa aislada de pulmón de skua en Bahía Esperanza en febrero del año 2000.

Calle 5: cepa aislada de un cuerpo de agua dulce en Bahía Esperanza en febrero del año 2001.

Calle 6 cepa aislada de hígado de pingüino Adelia en Bahía Esperanza en febrero del año 2001.

Calle 7: cepa aislada de pulmón de pingüino Adelia en Bahía Esperanza en febrero del año 2001.

Calle 9: cepa aislada de cavidad bucofaríngea de skua en Bahía Esperanza en febrero del año 2001.

Calle 10: cepa aislada de pulmón de skua en febrero del año 2001.

Calle 11: cepa aislada de hígado de skua en febrero del año 2001.

Calle 12: cepa aislada de cavidad bucofaríngea de gaviota cocinera en enero del año 2001.

Calles 1 y 14: Lambda Ladder PFGE Marker. Calles 2, 8 y 13: *Salmonella Braenderup*.

## CITAS BIBLIOGRAFICAS CORRESPONDIENTES A LAS PUBLICACIONES PARCIALES DEL TRABAJO DE TESIS

### TRABAJOS PUBLICADOS

1. Leotta G.A., Cerdá R., Coria N., Montalti D. 2001. Preliminary studies on some avian diseases in antarctic birds. *Polish Polar Research* 22: 229-233.
2. Leotta G.A., Paré J., Sigler L., Montalti D., Vigo G., Petruccelli M., Reinoso E.H. 2002. *Thelebolus microsporus* mycelial mats in the trachea of wild brown skua *Catharacta antarctica lonnbergi* and South Polar Skua *C. maccormicki* carcasses. *Journal of Wildlife Diseases* 38: 443-447.
3. Leotta G.A., Rivas M., Chinen I., Vigo G.B., Moredo F.A., Coria N., Wolcott M.J. 2003. Avian Cholera in a Southern Giant Petrel (*Macronectes giganteus*) from Antarctica. *Journal of Wildlife Diseases* 39: 732-735.
4. Baumeister E., Leotta G., Pontoriero A., Campos A., Montalti D., Vigo G., Pecoraro M., Savy V. 2004. Serological evidences of Influenza A virus infection in Antarctic migratory birds. *International Congress Series* 1263: 737-740.
5. De Hoog G.S., Gottlich E., Platas G., Genilloud O., Leotta G., Brummelen J.V. 2005. Evolution, taxonomy and ecology of the genus *Thelebolus* in Antarctica. *Studies in Mycology* 51: 33-76.
6. Leotta G.A., Chinen I., Vigo G., Pecoraro M., Rivas M. 2006. Outbreaks of Avian Cholera in Hope Bay, Antarctica. *Journal of Wildlife Diseases* 42: 259-270.

7. Leotta G.A., Vigo G.B., Chinen I., Prieto M., Callejo R., Rivas M. 2006. Identificación, biotipificación y caracterización de cepas de *Pasteurella multocida* aisladas en Argentina. *Revista Argentina de Microbiología* 38: 125-129.
8. Leotta G.A., Vigo G.B., Giacoboni G. 2006. Isolation of *Campylobacter lari* from seabirds in Hope Bay, Antarctica. *Polish Polar Research* 27: 303-308.
9. Leotta G.A., Chinen I., Vigo G.B., Gugliada J., Rivas M. 2006. Evaluación de dos técnicas de subtipificación molecular para el estudio de *Pasteurella multocida*. *Revista Argentina de Microbiología* 38: .
10. Nievas V.F., Leotta G.A., Vigo G.B. 2007. Subcutaneous clostridial infection in Adelie penguins in Hope Bay, Antarctica. *Polar Biology* 30: 249-252.